DIE SUPPRESSIVE WIRKUNG VON AZATHIOPRIN, CYCLOPHOSPHAMID UND ISOPHOSPHAMID AUF DIE IMMUNOLOGISCHE SOFORT- UND SPÄTREAKTION IM TIEREXPERIMENT

vorgelegt von
Hans-Dieter Brodehl
aus Herborn

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554404_0100

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Schölmerich

DIE SUPPRESSIVE WIRKUNG VON AZATHIOPRIN, CYCLOPHOSPHAMID UND ISOPHOSPHAMID AUF DIE IMMUNOLOGISCHE SOFORT- UND SPÄTREAKTION IM TIEREXPERIMENT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von
Hans-Dieter Brodehl
aus Herborn

*

Mainz 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. A. Mayet

Referent: Professor Dr. Dr. K. H. Meyer zum Büschenfelde

Korreferent: Professor Dr. P. Schölmerich

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.1972

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	4
2.1	Versuchstiere	4
2.2	Die immunosuppressiven Testsubstanzen	4
2.2.1	Dosierung und Applikation von Cyclophosphamid (Cp) und Isophosphamid (Ip)	4
2.2.2	Dosierung und Applikation von Azathioprin (Ap)	4
2.3	Immunisierungsverfahren	5
2.4	Blutentnahme	5
2.5	Blutbildkontrolle	5
2.6	Antigenbestimmung	5
2.7	Bestimmung der humoralen Antikörper	6
2.8	Nachweis der zellulären Immunreaktion	7
3.	Ergebnisse	8
3.1	Toxizität der getesteten Immunosuppressiva	8
3.1.1	Einfluß auf Körpergewicht und Gewichtszuwachsrate	8
3.1.2	Einfluß auf die Zahl der weißen Blutzellen	11
3.1.3	Einfluß auf das Differentialblutbild	15
3.1.4	Allgemeine Nebenwirkungen	17
3.2	Immunreaktionen	18
3.2.1	Humorale Primärreaktion	18
3.2.1.1	Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Azathioprin-Dosis	19
3.2.1.2	Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Cyclophosphamid-Dosis	22
3.2.1.3	Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Isophosphamid-Dosis	24
3.2.1.4	Verhalten der Antikörpertiter nach Absetzen der Medikation	27

Seite

3.2.2 Verhalten humoraler Immunreaktionen nach Zweitimmunisierung bei Tieren mit supprimierter Primärantwort 28

3.2.3 Humorale Sekundärreaktion 29

3.2.3.1 Die Wirkung von Azathioprin auf die Sekundärreaktion 30

3.2.3.2 Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die Sekundärreaktion 30

3.2.3.3 Die Wirkung von Isophosphamid auf die Sekundärreaktion 31

3.2.4 Zelluläre Immunreaktionen 31

3.2.4.1 Die Wirkung von Azathioprin auf die zelluläre Primär- und Sekundärreaktion 32

3.2.4.2 Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die zelluläre Primär- und Sekundärreaktion 33

3.2.4.3 Die Wirkung von Isophosphamid auf die zelluläre Primär- und Sekundärreaktion 34

3.2.4.4 Die Wirkung von Azathioprin, Cyclophosphamid und Isophosphamid auf die zelluläre Immunreaktion bei Tieren mit unterdrückter Primärantwort 34

4. Diskussion 36

4.1 Zur Suppression humoraler Immunreaktionen 36

4.1.1 Immunologische Primärreaktion 36

4.1.2 Immunologische Sekundärreaktion 39

4.2 Zur Suppression zellulärer Immunreaktionen 40

4.3 Zur Toxizität der gewählten Substanzen in Relation zur immunosuppressiven Aktivität 41

4.4 Kritische Einstufung der gefundenen Ergebnisse 42

5. Zusammenfassung 44

6. Literaturverzeichnis 45

1. EINLEITUNG

Die zunehmende klinische Bedeutung der Autoimmunkrankheiten und die ständig steigende Zahl von Organtransplantationen mit ihrer Problematik der Abstoßungsreaktion haben im letzten Jahrzehnt zu wichtigen Untersuchungen und Ergebnissen geführt. Mit Hilfe von Zytostatika hat man e i n e von vielen Möglichkeiten, in die immunologischen Reaktionen des Organismus einzugreifen und die zelluläre und/oder humorale Immunreaktion zu unterdrücken, d.h. immunosuppressiv zu wirken. So dienten im Tierexperiment und in klinischen Versuchen Immunosuppressiva zur Erforschung von gemeinsamen immunbiologischen Mechanismen.

Experimentell konnte beim Kaninchen erstmals von R. Schwartz (1959) mit 6-Mercaptopurin (6-Mp) die humorale Immunreaktion unterdrückt und eine spezifische Toleranz ausgebildet werden. Inzwischen gibt es umfassende Untersuchungen über die Induktion einer spezifischen Toleranz mittels Immunosuppressiva (Übersicht bei Hopf 1971). Weiterhin konnten Enhancement-Phänomene sowohl bei Nierentransplantaten am Kaninchen (Nathan 1960, mit 6-Mp) als auch bei Hauttransplantationen am Kaninchen (Robinson 1960, mit 6-Mp) und am Hund (Reams 1963, mit Endoxan) beobachtet werden.

Beim Menschen liegen ebenfalls Befunde über die Beeinflussung von zellulärer und humoraler Immunreaktion durch Immunosuppressiva vor. Übersichten über die Bedeutung solcher Substanzen bei Organtransplantationen geben Largiadèr (1970) und zur Beeinflussung von Autoimmunkrankheiten Scheiffarth (1969).

Im Schrifttum wurde immer wieder die unterschiedliche Wirkung zweier Stoffgruppen, die der Antimetaboliten und die der alkylierenden Substanzen, auf Immunreaktionen verglichen (Finger 1967, Hoppe 1967, Sterzl 1967, Potel 1969). Hier stand die Frage nach einer möglichst geringen Toxizität einerseits und einer effektiven immunosuppressiven Aktivität andererseits im Vordergrund. Während Sterzl in der In-vivo-Kultur nur mit den Purinantagonisten eine vollständige Immunosuppression erreichte, ergaben die drei anderen Experimente eine günstigere Beeinflussung der Immun-

reaktion durch alkylierende Substanzen.

Unter Berücksichtigung dieser zum Teil sehr heterogenen Ergebnisse, die unter anderem aus der unterschiedlichen Wahl von Tierspezies, Applikationsart, Dosierung der Medikamente, Antigenart, Antigenmenge und auch Immunisierungsmodus resultieren, dienen an einem bereits definierten Modell (Meyer zum Büschenfelde, Freudenberg 1969) die eigenen Experimente zum Vergleich der Wirkung äquivalenter Dosen dreier Immunosuppressiva auf die humorale und zelluläre immunologische Reaktion. Damit soll in erster Linie versucht werden, Voraussetzungen für eine geeignete Therapie zur Unterdrückung einer experimentell induzierten aktiven chronischen Hepatitis im Kaninchen zu schaffen (Meyer zum Büschenfelde 1969).

Als Vertreter der Antimetaboliten wurde ein Derivat des Purinantagonisten 6-Mercaptopurin (6-Mp), das Azathioprin (Ap), gewählt. Es ist in seinem immunsuppressiven Effekt und der gleichzeitig geringeren Nebenwirkung auf das Knochenmark dem 6-Mp überlegen (Hunstein 1967). Bei dieser Substanz erscheint wegen ihrer breiten Anwendung unter anderem eine Antwort auf die pharmakologischen Unterschiede einer oralen und parenteralen Applikation von Wichtigkeit.

Die beiden anderen Agenzien waren die alkylierenden Substanzen Cyclophosphamid (Cp), ein N-Lost-Derivat, und Isophosphamid (Ip), ein sekundäres Amid, bei dem die Basizität beider Stickstoffatome durch Phosphorylierung weitgehend aufgehoben ist (N. Brock 1967).

Die eigenen Experimente am Kaninchen mit den gewählten Immunosuppressiva sollen dabei zur Beantwortung folgender noch offener Fragen dienen:

1. Hat eine intraperitoneale Applikation von Azathioprin die gleiche Wirkung auf die immunologische Primärreaktion wie eine äquivalente oralapplizierte Medikation?

2. Sind alkylierende Substanzen, Cyclophosphamid (Cp) und Isophosphamid (Ip), in den Dosen, in denen Azathioprin oral (Ap) eine vollständige Unterdrückung der immunologischen Primärreaktion erreichte, äquivalent immunosuppressiv?

3. Wie ist der Einfluß der genannten Substanzen
   Ap intraperitoneal (i.p.) und oral
   Ip oral
   Cp oral auf die immunologische Sekundärreaktion?

4. Sind Unterschiede hinsichtlich der Depression der humoralen oder der zellulären Primär- bzw. Sekundärreaktion nachweisbar?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Gesunde ausgewachsene Neuseeland-Kaninchen beiderlei Geschlechts, fünf bis sechs Monate alt, 2,6 - 4,5 kg schwer, wurden einzeln oder paarweise in Drahtkäfigen eines klimatisierten Tierstalles gehalten. Als Futter erhielten sie Hauna-Kraftfutter L der Brückenmühle Hünfeld und Wasser ad libitum. Es wurden Gruppen von vier bis zehn Tieren beiderlei Geschlechts gebildet. Eine zweimalige Gewichtskontrolle pro Woche zeigte das Wachstum der Kaninchen an.

2.2 Die immunosuppressiven Testsubstanzen

2.2.1 Dosierung und Applikation von Cyclophosphamid (Cp) und Isophosphamid (Ip)

Die Präparate Endoxan (Cyclophosphamid: Cp) und ASTA Z 4942 (Isophosphamid: Ip) von den ASTA-Werken in Brackwede erhalten, wurden trocken als Pulver (reinst) im Kühlschrank aufbewahrt und vor jeder Medikation frisch hergestellt. Die Substanzen waren in aqua dest. nach fünfminütigem Rühren mit dem Magnetrührer vollständig aufgelöst, so daß etwa 1 ml dieser Lösung 10 - 12 mg Endoxan (Cp) bzw. ASTA Z 4942 (Ip) enthielt. Durch eine Plastiksonde wurde den Tieren 1,1 ml - 5,0 ml in den Schlund gegeben, so daß den Tieren je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 6 mg/kg/Tag oder 8 mg/kg/Tag Cp bzw. Ip oral appliziert wurde. Die zweimal wöchentlich gemessenen Gewichte gewährleisteten bei jedem Tier eine ihm angepaßte Medikamentdosis pro Kilogramm Körpergewicht.

2.2.2 Dosierung und Applikation von Azathioprin (Ap)

Imurel (Azathioprin: Ap) in Pulverform von der Wellcome GmbH erhalten, lagerte trocken im Kühlschrank und wurde vor jeder Medikation neu angesetzt. Ap wurde in aqua dest. durch zwanzigminütiges Rühren mit dem Magnetrührer homogen aufgeschwemmt, so daß sich in 1 ml der Suspension 10 mg Ap befanden. Den Tieren wurden 1,5 ml bis 5,0 ml Ap intraperitioneal (i.p.) injiziert, so daß entsprechend der Gruppe die Kaninchen 4, 6, 8, 12 und 15 mg/kg/Tag erhielten. Die Konstanz der Medikationsmenge pro Kilogramm wurde

durch zweimalige Gewichtskontrollen in der Woche bei jedem Tier aufrechterhalten.

Vier Tiere erhielten eine orale Applikation von 1,2 - 2,1 ml Ap, was einer Dosis von 6 mg/kg Ap entspricht.

Bei allen Tieren, die eine immunosuppressive Substanz bekamen, begann die Medikation sechs Tage vor (-6. Tag) der Immunisierung. Dabei richtet sich die Zählung der Tage nach dem Tag der Immunisierung (0. Tag). Die Applikation der Inhibitorsubstanzen wurde sukzessiv bis zum 36. Tag fortgesetzt.

2.3 Immunisierung

Alle Tiere erhielten am Tag 0 eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 100 mg humanem Serumalbumin (HSA) als Humanalbumin trokken "reinst" (Behringwerke Marburg) in 10 ml physiologischer NaCl gelöst.

2.4 Blutentnahme

Vor Versuchsbeginn und am 1., 4., 7., 10., 12., 18., 26., 36. Tag wurde aus der Hauptohrvene der Kaninchen Blut entnommen.

2.5 Blutbildkontrolle

Die Leukozyten wurden während der Zweitimmunisierung an den Tagen der Blutentnahme in der Zählkammer nach Thoma bestimmt. Parallel dazu wurden Blutausstriche angefertigt, durch Lufttrocknen fixiert und nach Pappenheim gefärbt.

2.6 Antigenbestimmung

Die Agardoppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony unter Verwendung von Anti-Human-Albumin des Kaninchens (Hyland) diente als orientierende Methode, um das Verschwinden des im Blutserum zirkulierenden Antigens (Ag, Human-Albumin) vor allem während der ersten beiden Wochen nach der Applikation zu erfassen (Talmage 1951).

2.7 Bestimmung der humoralen Antikörper

Das Auftreten der zirkulierenden Antikörper (AK) wurde in Anlehnung an die modifizierte Mikrotitrationstechnik von Sever (1962) nach der passiven Hämagglutination bestimmt. Hammelerythrozyten wurden 4 Minuten bei 3000 U/Min zentrifugiert, anschließend im Phosphatpuffer bei pH 8.0 (Zusammensetzung siehe bei Stavitsky 1954) gewaschen. Beide Vorgänge wurden wiederholt und anschliessend wurde nochmals zentrifugiert (4 Min. 3000 U/Min). Eine 50%ige Aufschwemmung des Sediments im Puffer (pH 8.0) mit gleicher Menge im Puffer gelöster Tanninsäure (2 mg/10 ml Puffer) wurde tanniert und darauf 10 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Nach Aufschütteln wurde das Inkubat 4 Minuten bei 500 U/Min zentrifugiert. Eine 20%ige Aufschwemmung der Zellen im Puffer (pH 8.0) wurde hergestellt und mit gleichem Volumen im Puffer gelösten Antigen (2,5 mg HSA/ml Puffer) sensitiert. Anstelle der mit Ag versehenen Puffermenge wurde bei den Kontrollansätzen ein gleiches Volumen NaCl oder Puffer (pH 8.0) dazugegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation im Wasserbad von 37° C wurden die Ansätze geschüttelt und bei 1500 U/Min 4 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde 1:10 in einem Puffer (pH 8.0) mit 1%igem Guinea Pig Serum (inaktiviert und absorbiert) aufgeschwemmt. Nach Zentrifugieren (4 Min. bei 3000 U/Min) wurde eine 50%ige Aufschwemmung mit dem Puffer hergestellt, so daß eine Endkonzentration der Zellen von 0,5 - 1,0 % erreicht wurde. Anschließend wurde in die Spezialkammern für die Hämagglutination in die obere Reihe alternierend 1 Tropfen Puffer und daneben 1 Tropfen inaktiviertes Kaninchen-Serum mit der Pasteur-Pipette eingefüllt. Von der zweiten Reihe an wurde mit der Tropfpipette in alle übrige Löcher 1 Tropfen Puffer gebracht. Mit der Spezialpipette stellte man dann eine Verdünnungsreihe durch Überpipettieren her. In jedes Loch wurde auf der einen Seite der Verdünnungsreihe 1 Tropfen der sensitierten Erythrozytenverdünnung und daneben in die Löcher je 1 Tropfen des Kontrollansatzes gegeben. Bei Zimmertemperatur standen die Kammern etwa 6 - 8 Stunden. Anschließend konnte man die Ergebnisse im Vergleich zu den Kontrollreihen makroskopisch ablesen.

2.8 Nachweis der zellulären Immunreaktion

Am 18. und 36. Versuchstag wurde auf einem enthaarten Areal der Kaninchenflanken die zelluläre Immunantwort getestet (analog Tuberkulintest). Jedes Tier erhielt eine intradermale Injektion von 1 mm^3 einer 100mg%igen HSA-Lösung und lateral daneben im Abstand von mehr als 2 cm eine Kontrollinjektion von 1 mm^3 NaCl ohne Ag. Nach 24 Stunden wurde im Verhältnis zur Kontrolle die Reaktion makroskopisch abgelesen. Hier wurde lediglich zwischen positiver und negativer Reaktion unterschieden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Toxizität der getesteten Immunosuppressiva

3.1.1 Einfluß auf Körpergewicht und Gewichtszuwachsrate

Bei den angewandten Agenzien ließ sich eine unterschiedliche Abhängigkeit der Wirkung von Medikament und Dosis auf das Körpergewicht bzw. die mittlere Gewichtszuwachsrate und auf den Anteil der verendeten Tiere nachweisen.

Die mittlere Gewichtszuwachsrate gibt Auskunft, wie weit die behandelten Gruppen von den unbehandelten Kontrolltieren in ihrer Körpergewichtszunahme differierten. Diese Relation wird zusammen mit der Anzahl der verendeten Tiere in Abb. 1 wiedergegeben.

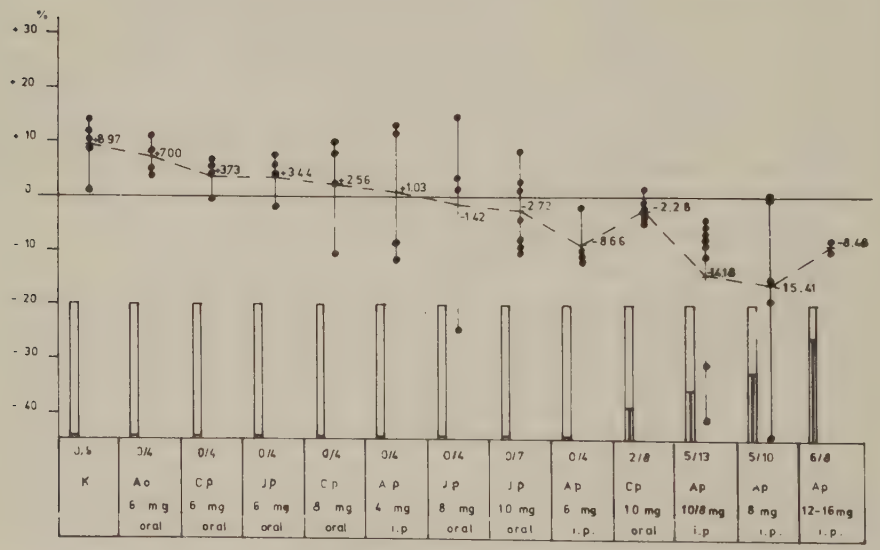

Abb. 1: Die mittlere Gewichtszuwachsrate und der Anteil der verendeten Tiere in Abhängigkeit von Medikament und Dosis

In der Abb. wird der Einfluß der Medikamente auf die mittlere Gewichtszuwachsrate mit ihren Spannweiten wiedergegeben. Die Gruppen sind so angeordnet, daß die Toxizität der Medikamente und der dazugehörigen Dosis von links nach rechts zunimmt. Die den Gruppen zugeordneten Säulendiagramme repräsentieren den Anteil der Letalität der Tiere, wobei die untenstehende Zahl hinter dem Schrägstrich die Gesamttierzahl der Gruppe und die Zahl vor dem Schrägstrich diejenige der verendeten Tiere angibt. Besonders bei der Ip 8 mg-Gruppe fällt auf, daß durch extrem abweichendes Verhalten eines Tieres der arithmetische Mittelwert bei großer individueller Streubreite nicht unbedingt repräsentativ für die Gruppe sein muß.

Gleichzeitig zeigt diese Darstellung von links nach rechts den Anstieg der toxischen Wirkung der jeweiligen Medikamente und der entsprechenden Dosen.

I. Kontrollen: Die Tiere dieser Gruppe wurden lediglich zweimal immunisiert und blieben ansonsten unbehandelt. Mit einem Gewichtszuwachs von durchschnittlich +8,97 % gegenüber dem Ausgangsgewicht und den Spannweiten von +1,42 % und +14,66 % in der Zeit vom -6. Tag bis zum 36. Tag verzeichnete die Kontrollgruppe die höchste Zuwachsrate.

II. Cp 6 mg/kg/Tag (oral): Die Tiere dieser Gruppe zeigten eine leichte Einschränkung der Gewichtszunahme. Mit dem stetigen Anstieg des Durchschnittsgewichtes wurde am 36. Tag eine mittlere Zuwachsrate von +3,73 % des Ausgangsgewichtes erreicht.

III. Cp 8 mg/kg/Tag (oral): Der mittlere Gewichtszuwachs von +2,56 % weist im Vergleich zu Gruppe II darauf hin, daß Dosis und Körpergewichtsveränderung in reziprokem Verhältnis stehen. Mit Spannweiten von +10,33 % und -10,82 % fällt eine große Streubreite bei relativ wenigen Tieren auf.

IV. Cp 10 mg/kg/Tag (oral): Nach einer dreimonatigen Pause erhielten alle Tiere der Gruppen II und III 6 Tage vor bis 36 Tage nach der Zweitimmunisierung 10 mg Cp peroral. Obwohl die Gewichtszuwachsrate mit -2,28 % nur wenig unter dem Ausgangsgewicht lag, wurde eine erhebliche Toxizität durch das Verenden zweier Tiere am 26. Tag und 32. Tag registriert.

V. Ip 6 mg/kg/Tag (oral): Auch diese Gruppe konnte mit einem Gewichtszuwachs von durchschnittlich +3,44 % eine retardierte Zunahme des Ausgangsgewichtes verzeichnen. Jedoch lag das Körpergewicht bei Spannweiten von +7,35 % und -0,64 % bei einem Tier bereits unter dem Ausgangswert.

VI. Ip 8 mg/kg/Tag (oral): Besonders in dieser Gruppe wird demonstriert, daß bei einer großen Streubreite mit relativ wenigen Tieren eine mittlere Gewichtszuwachsrate von -1,42 % nur eine bedingte Aussagekraft besitzt. Während drei Tiere eine Gewichtszunahme von durchschnittlich +6,44 % zeigten, war für ein Tier 8 mg Ip derart toxisch, daß es nach einem terminalen Gewichtssturz von

-25,0 % im medikamentfreien Intervall am 50. Tag verendete.

VII. Ip 10 mg/kg/Tag (oral): Alle Tiere der Gruppen V und VI bekamen 6 Tage vor bis 36 Tage nach der Zweitimmunisierung 10 mg Ip peroral. Mit -2,72 % Gewichtszuwachsrate lag die Toxizität im Verhältnis zur Cp-Gruppe IV in einem günstigeren Bereich, da alle Tiere die Medikation überstanden.

VIII. Ap 6 mg/kg/Tag (oral): Die mittlere Gewichtszuwachsrate betrug bei dieser Gruppe unter Medikation +7,0 % und wich damit nur unwesentlich vom Wert der Kontrollgruppe ab.

IX. Ap 4 mg/kg/Tag (i.p.): Ap 4 mg erlaubte gegenüber den Ausgangsgewichten den Kaninchen dieser Gruppe nur noch eine mittlere Gewichtszuwachsrate von +1,03 %. Eine große Streubreite bei relativ wenigen Tieren ist an den Spannweiten von +13,23 % und -11,54 % ablesbar.

X. Ap 6 mg/kg/Tag (i.p.): 6 mg Ap bei i.p. Applikation erreichten mit einer Gewichtszuwachsrate von -8,66 % Durchschnittswerte, die unter den Werten aller bisher beschriebenen Gruppen lagen. Allerdings muß die toxische Wirkung günstiger als die der Cp-Gruppe IV bewertet werden, da bei 6 mg Ap i.p. kein Tier im Laufe der Medikation verendete.

XI. Ap 8 mg/kg/Tag (i.p.): Bei einer i.p. Applikation von 8 mg Ap sank das mittlere Körpergewicht dieser Gruppe um -7,65 %. Am 16. und 22. Tag verendeten je ein Tier, am 32. Tag zwei Tiere, so daß 8 mg/kg/Tag für vier von zehn Tieren eine letale Dosis war. Ein weiteres Tier reagierte mit einem terminalen Gewichtssturz und verendete zwei Tage nach Absetzen der Substanz.

XII. Ap 10 mg/8 mg/kg/Tag (i.p.): Alle Tiere der Gruppen IX, X und XI erhielten 6 Tage vor bis 36 Tage nach der Zweitimmunisierung 10 mg Ap i.p., jedoch wurde die Dosis am 7. Tag auf 8 mg reduziert, da bereits am 2. Tag (8 Tage nach Medikationsbeginn) ein Tier verendet war und die anderen Tiere rapide an Gewicht verloren hatten. Vier weitere Tiere verendeten am 11., 21., 22. und 32. Tag. Das mittlere Gesamtgewicht nahm bis zum Ende um -14,18 % des Ausgangsgewichtes ab.

XIII. Ap 12 mg/kg/Tag (i.p.): Mit einer Substanzmenge von 12 mg Ap erhielten die Tiere eine Dosis, die bei drei Tieren interkurrent am 8., 10. und 30. Tag zum Tode führte. Bei einem Tier wurde vom 20. Tag an Ap zeitweilig abgesetzt. Dennoch konnte sich das Tier nicht mehr erholen und verendete am 55. Tag.

XIV. Ap 15 mg/kg/Tag (i.p.): 15 mg Ap führte bei zwei Tieren am 10. Tag und bei einem Tier am 27. Tag zum Tode. Das vierte Tier überlebte das Versuchsende nur acht Tage.

Ap 12 - 15 mg gab den meisten Tieren nicht genügend Zeit, ihr Gewicht rapide zu verlieren. So sank zwar das Durchschnittsgewicht im Vergleich zu den vorigen Gruppen nicht weiter, jedoch kamen schließlich alle Tiere infolge der Medikamentwirkung ad exitum.

Bei allen mit Immunosuppressiva behandelten Tieren machte sich nach Absetzen der Medikation ein beschleunigter Anstieg aller Durchschnittsgewichte bemerkbar.

3.1.2 Einfluß auf die Zahl der weißen Blutzellen

Die Abb. 2.0 dokumentiert das Verhalten der durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihrer Spannweiten bei den Kontrolltieren. Am 7. Tag bildete sich bei einer großen individuellen Streubreite mit relativ wenigen Tieren ein Gipfel der Leukozytenzahlen (12900/mm^3) aus. Nach anschließendem Leukozytenabfall am 10. Tag stiegen die Werte kontinuierlich an.

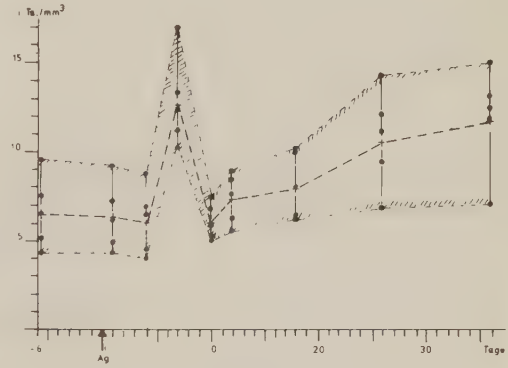

Abb. 2.0: Verhalten der Leukozytenzahlen nach Immunisierung

Die Abb. 2.0 - 2.6 stellen die durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihre Spannweiten der einzelnen Gruppen dar.
Die vorliegende Kontrollgruppe wird mit ihren Durchschnittswerten und maximalen Abweichungen (K -- K) in den folgenden Abb. 2.1 - 2.6 als Vergleich übernommen.
Die AK-Titer bilden am 7. Tag einen durchschnittlichen Gipfelwert von 12900 mm^3. Nach anschließendem Leukozytenabfall am 10. Tag Steigen die Werte kontinuierlich an.

Die Abb. 2.1 zeigt die durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihre Spannweiten der Gruppe IV (10 mg Cp) im Verhältnis zu den Durchschnittswerten bzw. maximalen Abweichungen der Kontrollgruppe. Bei einer großen individuellen Streubreite bildete sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein verlängerter Gipfel (6400/mm^3) vom 7. bis 12. Tag. Dann fielen die mittleren Leukozytenwerte bis zum 26. Tag ab (2700/mm^3).

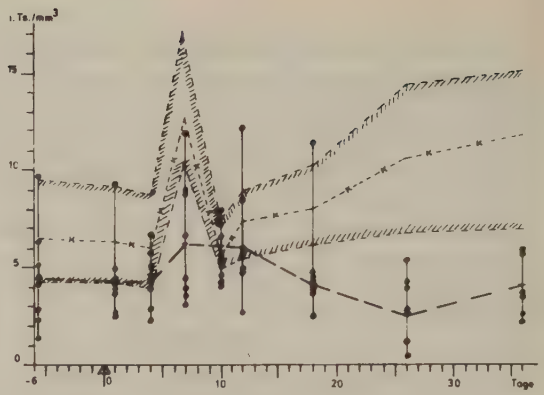

Abb. 2.1: Verhalten der Leukozytenzahlen unter dem Einfluß von 10 mg Cp oral

Vgl. Abb. 2.0
Am 7. Tag und nach dem 12. Tag sind deutliche Unterschiede der beiden Kurven festzustellen.

Die Abb. 2.2 zeigt die durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihre Spannweiten der Gruppe VII (10 mg Ip) im Verhältnis zu den Durchschnittswerten bzw. den maximalen Abweichungen der Kontrollgruppe. Bei einer großen individuellen Streubreite fielen die Werte am 1. Tag (7 Tage Medikation) auf durchschnittlich 2800/mm^3, um bereits am 4. Tag wieder den Ausgangswert zu erreichen. Sie sanken bis zum 10. Tag leicht ab, stiegen am 12. Tag auf einen Wert von (6400/mm^3), um bis zum 26. Tag auf 2100/mm^3 abzunehmen.

Abb. 2.2: Verhalten der Leukozytenzahlen unter dem Einfluß von 10 mg Ip oral

Vgl. Abb. 2.0
Im Zeitraum vom 4. - 10. Tag bei relativ niedrigen Leukozytenzahlen und im Abfallen der Leukozytenwerte nach dem 12. Tag sind deutliche Unterschiede der beiden Kurven zu erkennen.

Die Abb. 2.3 zeigt die durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihre Spannweiten der Gruppe VIII (6 mg Ap oral) im Verhältnis zu den Durchschnittswerten bzw. den maximalen Abweichungen der Kontrollgruppe. Die mittleren Leukozytenwerte stiegen nur mäßig am 7.- 10. Tag (8500/mm^3) an, um anschließend im Gegensatz zu den Gruppen mit Cp, Ip und Ap (i.p.) konstant diesen Wert bis zum 16. Tag zu halten.

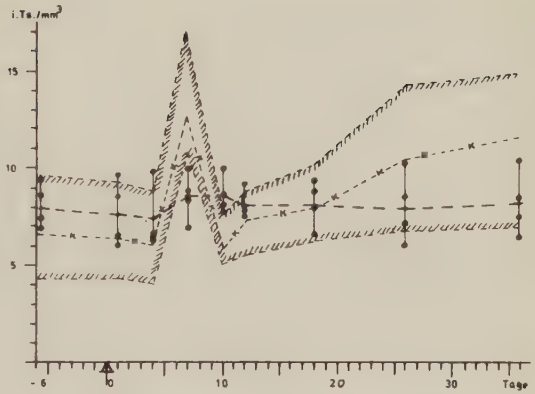

Abb. 2.3: Verhalten der Leukozytenzahlen unter dem Einfluß von 6 mg Ap oral

Es fällt auf, daß im Vergleich zu den Abb. 2.1 und 2.2 die Durchschnittswerte nach dem 12. Tag nicht absinken.

Die Abb. 2.4 stellt die durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihre Spannweiten der Gruppe XII (10 mg/8 mg Ap i.p.) im Verhältnis zu den Durchschnittswerten bzw. den maximalen Abweichungen der Kontrollgruppe dar. Ähnlich der Gruppe VII (10 mg Ip) fiel unter dem Einfluß von Ap 10 mg/8 mg i.p. der Durchschnittswert der Leukozyten am 1. Tag auf 4300/mm^3, stieg am 4. Tag auf 7200/mm^3, erreichte kontinuierlich abfallend am 10. Tag 4100/mm^3, um dann am 12. Tag von 6100/mm^3 ständig bis zum 26. Tag zu sinken. Es fällt eine ungewöhnlich große Streubreite auf.

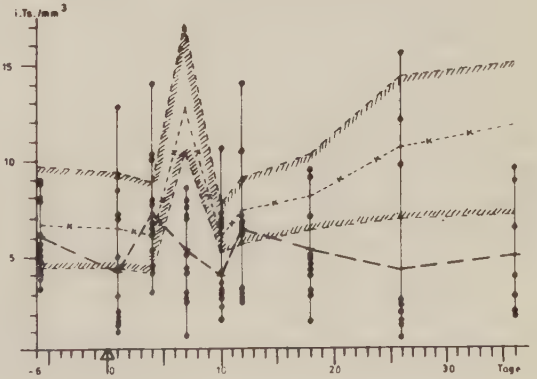

Abb. 2.4: Verhalten der Leukozytenzahlen unter dem Einfluß von 10 mg/8 mg Ap i.p.

Vgl. Abb. 2.0
Bei dieser Darstellung muß die ungewöhnlich große Streubreite beachtet werden.

Die Abb. 2.5 und die Abb. 2.6 veranschaulichen den Verlauf der durchschnittlichen Leukozytenzahlen und ihre Spannweiten der Gruppen XIII (12 mg Ap i.p.) und XIV (15 mg Ap i.p.) im Verhältnis zu den Durchschnittswerten bzw. den maximalen Abweichungen der Kontrollgruppe. Die mittleren Leukozytenwerte entwickelten sich kontinuierlich zu einer Leukopenie. Je drei Tiere verendeten interkurrent. Auch zeitweiliges Absetzen der Medikation vom 21. bis zum 23. Tag konnte nicht verhindern, daß die zwei übrigen Tiere am 44. Tag und am 55. Tag ad exitum kamen.

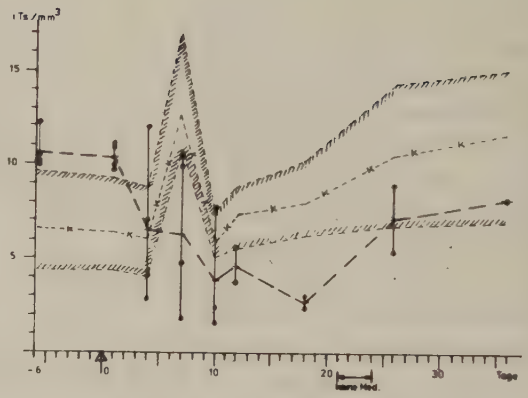

Abb. 2.5: Verhalten der Leukozytenzahlen unter dem Einfluß von 12 mg Ap i.p.

Vgl. Abb. 2.0
Nach dem Absetzen der Medikation vom 21. bis einschl. 23. Tag stiegen die Leukozytenzahlen merklich an.

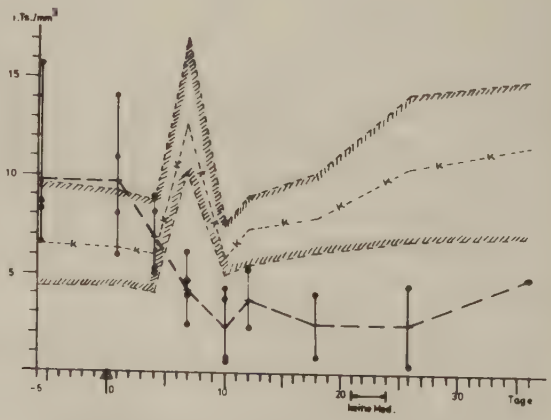

Abb. 2.6: Verhalten der Leukozytenzahlen unter dem Einfluß von 15 mg Ap i.p.

Vgl. Abb. 2.0
Das Absetzen der Medikation vom 21. bis einschl. 23. Tag hatte keinen Einfluß mehr auf die Leukozytenzahlen.

3.1.3 Einfluß auf das Differentialblutbild

Die Abb. 3.0 bis 3.4 dokumentieren den prozentualen Anteil der Lymphozyten am Gesamtleukozytenbild. Aus der graphischen Darstellung geht hervor, daß die Durchschnittswerte der Cp-, Ip-, Ap-Gruppen zu denen der Kontrollgruppe keine bemerkenswerte Differenzen bieten. Lediglich am 12. Tag fällt sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der Cp- und Ip-Gruppe (IV und VII) eine schmale Streubreite auf. Dies steht im Gegensatz zu den sonst großen individuellen Streubreiten. Eine selektive Beeinflussung mononukleärer Zellen bzw. der Granulozyten läßt sich somit nicht nachweisen.

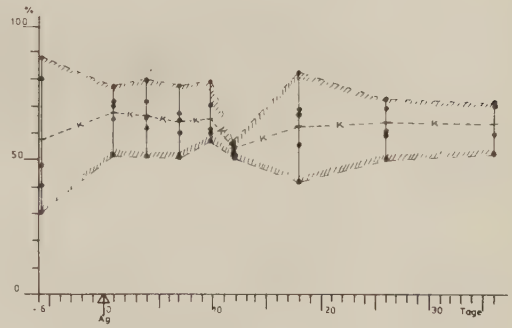

Abb. 3.0: Verhalten des Differentialblutbildes im Anschluß an eine Immunisierung

Die Abb. 3.0 - 3.4 zeigen den prozentualen Anteil der Lymphozyten am Gesamtleukozytenbild innerhalb der einzelnen Gruppen als Durchschnittswerte und deren Spannweiten.
Am 12. Tag fällt eine ungewohnlich enge Streubreite auf.

Abb. 3.1: Verhalten des Differentialblutbildes unter dem Einfluß von 10 mg Cp

Vgl. Abb. 3.0
Im Vergleich zur Kontrollgruppe fällt eine große individuelle Streubreite auf.

Abb. 3.2: Verhalten des Differentialblutbildes unter dem Einfluß von 10 mg Ip

Vgl. Abb. 3.0

Abb. 3.3: Verhalten des Differentialblutbildes unter dem Einfluß von 6 mg Ap oral

Vgl. Abb. 3.0

Abb. 3.4: Verhalten des Differentialblutbildes unter dem Einfluß von 10 mg/8 mg Ap i.p.

Vgl. Abb. 3.0
Es zeigt sich eine ungewöhnlich große individuelle Streubreite.

3.1.4 Allgemeine Nebenwirkungen

Bei den Tieren aller mit Medikamenten behandelten Gruppen traten neben den beschriebenen Gewichtsdepressionen und den Tendenzen zur Leukopenie eine verstärkte Disposition zu Infektionen auf. Durchfallneigung und bei einigen Kaninchen rhinitis contagiosa cuniculorum kamen passager vor. Zwei Tiere, eines aus den Cp- und eines aus den Ap-Gruppen, entwickelten eine Meningitis.

3.2 Immunreaktionen

3.2.1 Humorale Primärreaktion

Zur Beurteilung der immunosuppressiven Wirksamkeit von Ap, Ip und Cp auf die immunologische Primärreaktion vom Sofort-Typ wurde der Beginn der AK-Bildung mit den AK-Titern in den verschiedenen Gruppen verglichen. Bei der unbehandelten Kontrollgruppe I (Tab.1) setzte die AK-Produktion, gemessen am Verschwinden des Antigens, V-Ag (siehe bei Talmage 1951), am 4. Tag ein. Das Erscheinen zirkulierender Antikörper, E-AK, wurde ebenfalls am 4. Tag in Titern von 1:2 bis 1:8 registriert (Abb. 4.0). Der AK-Gipfel bildete sich

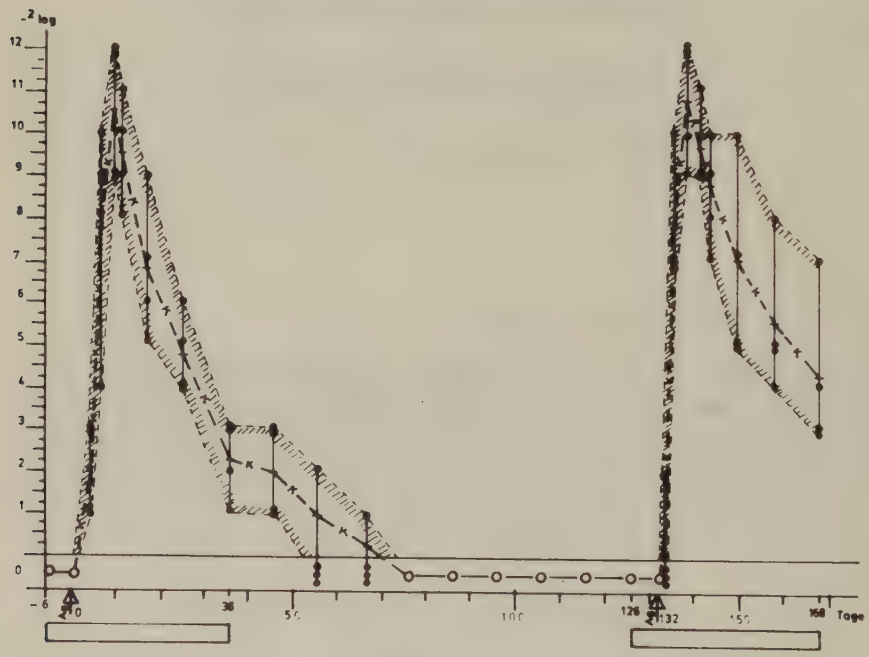

Abb. 4.0: Die humorale Antikörperantwort der Kontrollgruppe

Die Abb. 4.0 - 4.6 gibt die humorale Antikörperreaktion der einzelnen Gruppen wieder. Die Abszisse stellt den zeitlichen Ablauf in Tagen, die Ordinate die AK-Titer im $-^2$log dar (1 ≙ Titer 1:2, 2 ≙ Titer 1:4, 3 ≙ Titer 1:8 usw.). Das Rechteck unter der Abszisse repräsentiert den Zeitraum, in dem die anderen Gruppen Immunosuppressiva erhielten. Die Pfeile an den Tagen 0. und 132. geben die Tage der Immunisierung an. Die vorliegende Kontrollgruppe wird mit ihren Durchschnittswerten und maximalen Abweichungen (K -- K) in den folgenden Abb. 4.1 - 4.6 als Vergleich übernommen.

am 10. Tag aus mit Titerstufen von 1:512 bis 1:4096 und fiel kontinuierlich ab, so daß am 76. Tag bei keinem Tier mehr AK nachweisbar waren.

Innerhalb der Kontrollgruppe befand sich ein Tier, das keine AK produzierte; jedoch reagierte dieses Tier nach der zweiten Immunisierung wie ein vorsensibilisiertes Tier.

Tabelle 1: Die Wirkung von Azathioprin (i.p.) und das Verhalten der Kontrolltiere während der immunologischen Primärreaktion

Tage der Blutentnahme	Azathioprin (i.p.) 4 mg		6 mg		Kontrollen	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/4	0/4	0/4	0/4	0/5	0/5
1.	4/4	0/4	4/4	0/4	4/5	0/5
4.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
7.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
10.	3/4	0/4	3/4	0/4	0/5	4/5
12.	1/4	0/4	3/4	0/4	0/5	4/5
18.	0/4	2/4	0/4	1/4	0/5	4/5
26.	0/4	2/4	0/4	2/4	0/5	4/5
36.	0/4	2/4	0/4	2/4	0/5	4/5

Die Zahl vor dem Schrägstrich repräsentiert die Anzahl der Tiere, bei denen AK bzw. Ag nachweisbar waren, während die Zahl nach dem Schrägstrich die Gesamtzahl der Tiere innerhalb der Gruppe darstellt. Diese Anordnung gilt für Tabelle 1 - 8.
Die AK-Titer während der Behandlung reichten in den Ap-Gruppen von 1:2 bis 1:16, in der Kontrollgruppe bis 1:4096.
Ein Tier der Kontrollgruppe bildete keine AK.

3.2.1.1 Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Azathioprin-Dosis

Eine Dosis von 4 mg/kg/Tag Ap i.p. (siehe Tab. 1) erreichte einen verzögerten Eintritt der AK-Produktion. Das Verschwinden des Ag's, V-Ag, setzte erst am 10. Tag bei einem von vier Tieren ein. Noch am 12. Tag ließ sich bei einem Tier Ag im Serum nachweisen. Am 18. Tag begann bei zwei Tieren E-AK mit AK-Titern von 1:2 und 1:4 (siehe Abb. 4.1). Diese Titer stiegen am 36. Tag bis 1:16 an. Das anschließende Absetzen der Medikation führte bei jedem Tier dieser Gruppe zu einem rapiden Anstieg der AK-Titer, die am 56. Tag (20 Tage nach Absetzen) Werte von 1:128 bis 1:2048 erreichten. Die graphische Darstellung der durchschnittlichen AK-Titer und ihrer Standardabweichungen in Abb. 4.1 verdeutlicht, daß eine tägliche Dosis von 4 mg/kg Ap i.p bei zwei Tieren ein verzögertes Einsetzen der AK-Produktion bewirkte. Die AK-Konzentrationen bei allen Tieren erreichten Titerwerte von 1:128 bis 1:2048, die sich von denen der Kontrollgruppe nicht wesentlich unterschieden.

Bei den Tieren der Gruppe X, die mit 6 mg/kg/Tag Ap i.p. behandelt wurden, setzte das V-Ag erst am 10. Tag ein und war bei drei Tieren am 18. Tag beendet (siehe Tab. 1). AK erschienen am 18.

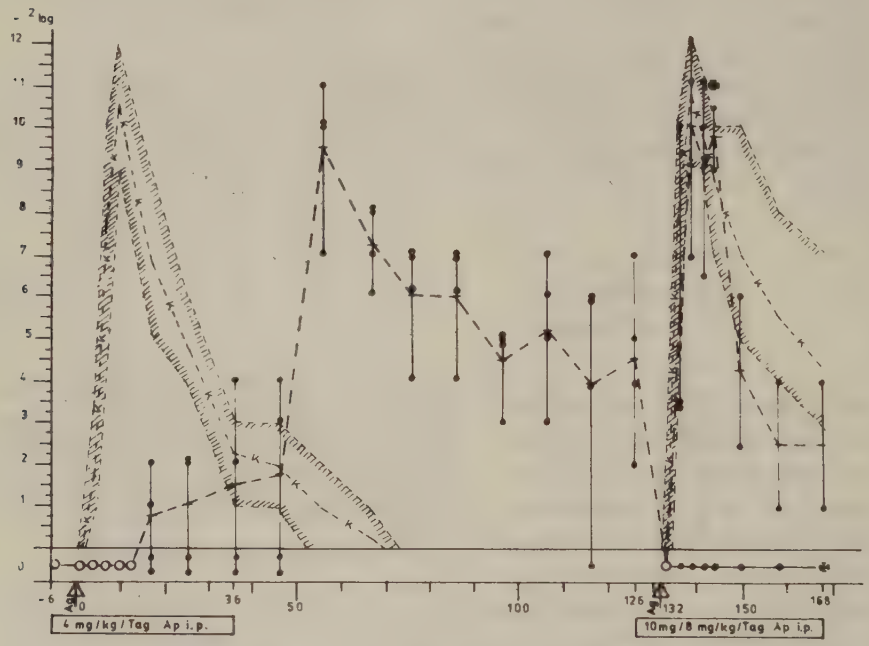

Abb. 4.1: Der Einfluß von 4 mg Ap i.p. auf die humoralen Antikörperreaktionen

Vgl. Abb. 4.0
Nach Absetzen der Medikation war ein Anstieg der AK-Titer auf Werte der Kontrollgruppe auffallend. Während der Sekundärreaktion waren keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festzustellen.

Tag bei einem Tier in einem Titer von 1:4 (Abb. 4.2). Am 26. Tag hatten zwei von vier Tieren AK-Titer von 1:8. Die AK-Titer bei drei von vier Tieren dieser Gruppe stiegen ebenfalls nach Absetzen der Medikation steil an und erlangten Titer von 1:64 bis 1:4096. Ein Tier hatte auch nach Absetzen der Medikation keine AK im Serum.

In der Gruppe XI mit 8 mg/kg/Tag Ap i.p. setzte das V-Ag nach dem 12. - 36. Tag ein (Tab. 2). Während und nach der Medikamentapplikation konnten keine AK registriert werden. Vier Tiere verendeten durch die Toxizität von Azathioprin.

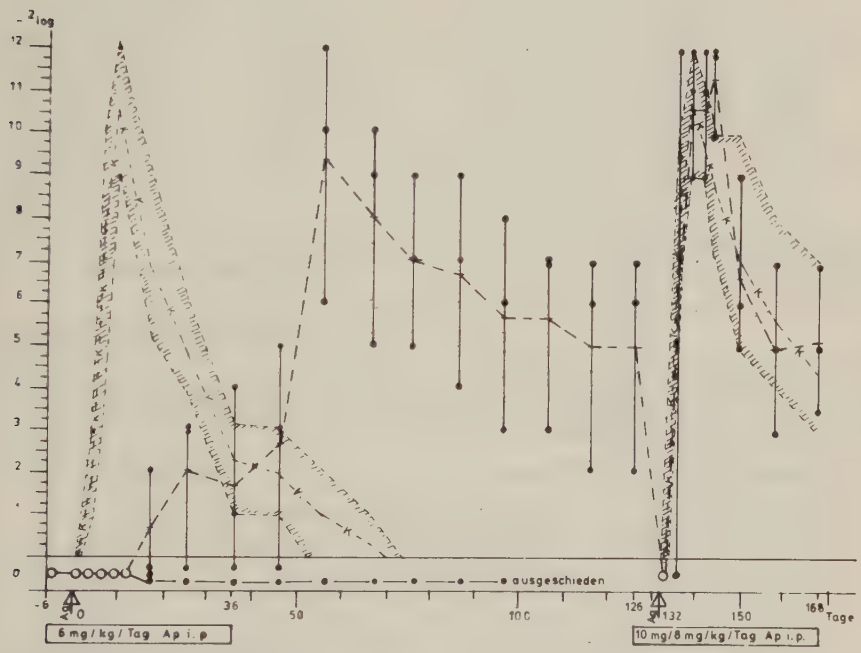

Abb. 4.2: Der Einfluß von 6 mg Ap i.p. auf die humoralen Antikörperreaktionen

Vgl. Abb. 4.0
Die AK-Titer lagen mit ihren Durchschnittswerten nach Absetzen der Medikation leicht unter den Kontrollwerten. Bei einem Tier konnte die Primärreaktion auch im medikamentfreien Intervall unterdrückt werden, so daß es aus der Beobachtung während der Sekundärreaktion ausgeschlossen werden konnte. Die AK-Titer der übrigen Tiere erreichten nach Zweitimmunisierung zum Teil größere Werte als die vergleichbaren Kontrollen.

Die Wirkung von 12 mg/kg/Tag Ap i.p. auf die Primärreaktion hatte ein V-Ag vom 10. - 18. Tag zur Folge (Tab. 2). Bei allen Kaninchen der Gruppe XII wurden bis zum Tode keine AK gemessen.

Die Gruppe XIII mit 15 mg/kg/Tag Ap i.p. (Tab. 3) wies bereits am 7. Tag ein V-Ag auf, das bis zum 36. Tag reichte. Bis zum Tode war eine E-AK nicht aufgetreten.

Tabelle 2: Die Wirkung von Azathioprin (i.p.) und das Verhalten der Kontrolltiere während der immunologischen Primärreaktion

Tage der Blutentnahme	Azathioprin (i.p.) 8 mg		12 mg		Kontrollen	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/10	0/10	0/4	0/4	0/5	0/5
1.	10/10	0/10	4/4	0/4	4/5	0/5
4.	10/10	0/10	4/4	0/4	3/5	4/5
7.	10/10	0/10	4/4	0/4	3/5	4/5
10.	10/10	0/10	2/3	0/3	0/5	4/5
12.	10/10	0/10	2/2	0/2	0/5	4/5
18.	4/9	0/9	0/2	0/2	0/5	4/5
26.	3/9	0/9	0/2	0/2	0/5	4/5
36.	2/6*	0/6	0/1**	0/1	0/5	4/5

*) Vier Tiere der Gruppe XI (8 mg Ap i.p.) verendeten durch die Toxizität von Azathioprin.
**) Drei Tiere der Gruppe XIII (12 mg Ap i.p.) kamen durch die Toxizität von Azathioprin ad exitum.

Vgl. Tab. 1
Die AK-Titer während der Behandlung waren in den Ap-Gruppen 0, in der Kontrollgruppe reichten sie von 1:2 bis 1:4096.
Ein Tier der Kontrollgruppe bildete keine AK.

Tabelle 3: Die Wirkung von Azathioprin (i.p. und oral) und das Verhalten der Kontrolltiere während der immunologischen Primärreaktion

Tage der Blutentnahme	Azathioprin 15 mg i.p.		6 mg oral		Kontrollen	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/4	0/4	0/4	0/4	0/5	0/5
1.	4/4	0/4	4/4	0/4	4/5	0/5
4.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
7.	3/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
10.	2/4	0/4	4/4	0/4	0/5	4/5
12.	2/2	0/2	3/4	0/4	0/5	4/5
18.	1/2	0/2	3/4	0/4	0/5	4/5
26.	1/2	0/2	2/4	0/4	0/5	4/5
36.	0/1*	0/1	0/4	0/4	0/5	4/5

*) Drei Tiere der Gruppe XIV (15 mg Ap i.p.) verendeten durch die Toxizität von Azathioprin.

Vgl. Tab. 1
Die AK-Titer während der Behandlung waren in den Ap-Gruppen 0, in der Kontrollgruppe reichten sie von 1:2 bis 1:4096.
Ein Tier der Kontrollgruppe bildete keine AK.

Im Serum der Tiere aus der Gruppe VIII mit 6 mg/kg/Tag Ap oral setzte das V-Ag am 12. Tag ein und dauerte bis zum 26. Tag (Tab. 3). AK konnten weder während der Medikation noch nach Absetzen der Substanz festgestellt werden.

3.2.1.2 Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Cyclophosphamid-Dosis

Die Tab. 4 zeigt, daß bei der Gruppe II mit 6 mg/kg/Tag Cp oral ein Verschwinden des Ag's (V-Ag) vom 10. bis nach dem 12. Tag gemessen wurde. Das E-AK setzte erst am 26. Tag bei zwei von vier Tieren mit Titern von 1:2 bis 1:4 ein (Abb. 4.3).

Tabelle 4: Die Wirkung von Cyclophosphamid (oral) und das Verhalten der Kontrolltiere während der immunologischen Primärreaktion

Tage der Blutentnahme	Cyclophosphamid (oral) 6 mg		8 mg		Kontrollen	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/4	0/4	0/4	0/4	0/5	0/5
1.	4/4	0/4	4/4	0/4	4/5	0/5
4.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
7.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
10.	3/4	0/4	4/4	0/4	0/5	4/5
12.	3/4	0/4	4/4	0/4	0/5	4/5
18.	0/4	0/4	1/4	0/4	0/5	4/5
26.	0/4	2/4	0/4	2/4	0/5	4/5
36.	0/4	2/4	0/4	2/4	0/5	4/5

Vgl. Tab. 1
Die AK-Titer während der Behandlung reichten in den Cyclophosphamid-Gruppen von 1:2 bis 1:4, in der Kontrollgruppe bis 1:4096.
Ein Tier der Kontrollgruppe bildete keine AK.

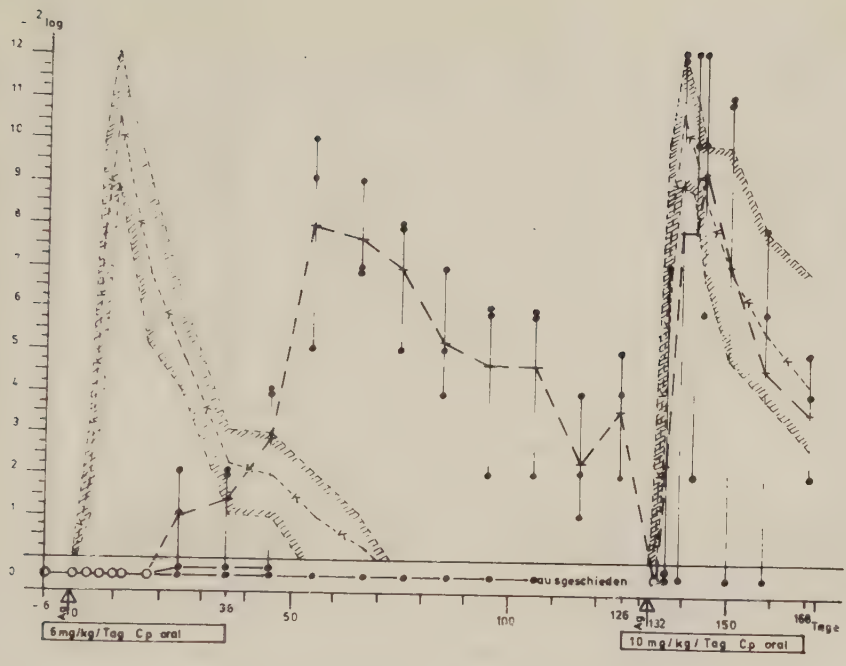

Abb. 4.3: Der Einfluß von 6 mg Cp oral auf die humoralen Antikörperreaktionen

Vgl. Abb. 4.0
Schon unter Medikation begannen zwei Tiere, humorale AK-Titer zu bilden. Der Durchschnittstiter mit 1:256 lag weit unter dem der Kontrollwerte. Ein Tier zeigte vollständige Immunosuppression der Primärantwort (ausgeschieden für Sekundärantwort). 10 mg/kg haben auf die Sekundärreaktion einen depressiven, jedoch nicht suppressiven Effekt.

Nach Absetzen der Substanz entwickelten drei Tiere AK-Titer mit einem Gipfel am 56. Tag von 1:32 bis 1:1024. Ein Tier produzierte keine zirkulierenden AK und konnte somit die Primärreaktion vollständig unterdrücken.

Bei 8 mg/kg/Tag Cp oral bewirkte die Gruppe III eine Verzögerung des Einsetzens der AK-Produktion. Das V-Ag begann erst nach dem 12. Tag und dauerte bis über den 18. Tag (Tab. 4). Bei zwei von vier Tieren tauchten AK am 26. Tag mit AK-Titern von 1:2 und 1:4 auf. Nach Beenden der Medikation stiegen am 67. Tag die AK-Titer auf 1:128 und 1:2048 (Abb. 4.4). Bei zwei Tieren wurde die Immunantwort unter der Substanzapplikation völlig unterdrückt, während

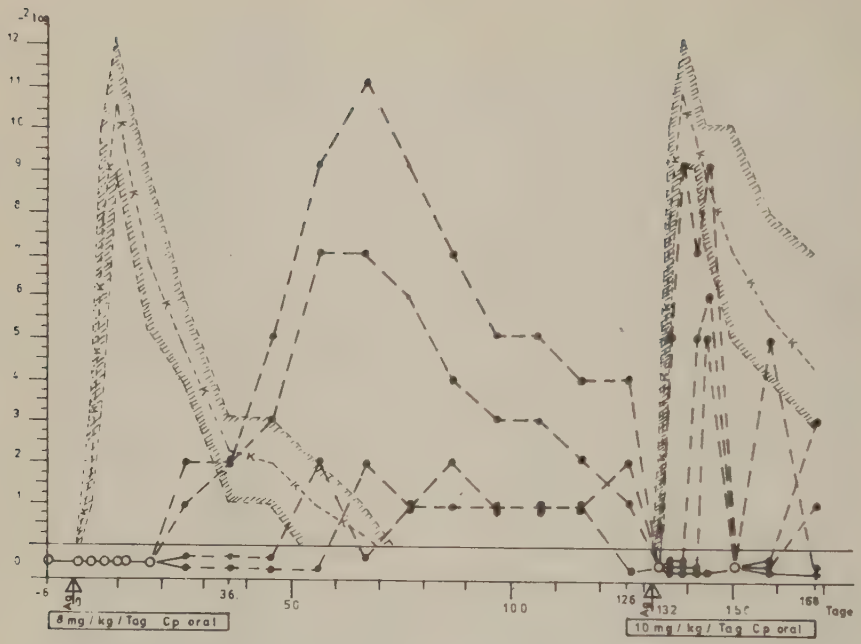

Abb. 4.4: Der Einfluß von 8 mg Cp oral auf die humoralen Antikörperreaktionen

Vgl. Abb. 4.0
8 mg bewirkt bei zwei Tieren eine fast vollständige Supprimierung der Primärreaktion, da hier nur AK-Titer von höchstens 1:4 auftreten. Die humorale Immunreaktion auf einen zweiten Ag-Stimulans bei Cp-Dosen von 10 mg/kg entspricht zeitlich und quantitativ eher einer Primärreaktion.

nach Absetzen der Medikamente nur Titer in Konzentrationsstufen von 1:2 und 1:4 registriert werden konnten. Infolge der niedrigen Werte kann man annehmen, daß die Primärreaktion bei zwei Tieren durch 8 mg Cp vollständig supprimiert wurde.

3.2.1.3 Antikörpertiter in Abhängigkeit von der Isophosphamid-Dosis

Die Tab. 5 verdeutlicht die Auswirkung einer oralen Applikation von 6 mg/kg/Tag Ip (Gruppe V) auf die humorale AK-Produktion. Das V-Ag setzte bei den Tieren der Gruppe V erst nach dem 12. Tag ein und reichte über den 18. Tag hinaus. Bis zum Ende der Medikation ließ sich kein E-AK feststellen. Somit wies Ip oral gegen-

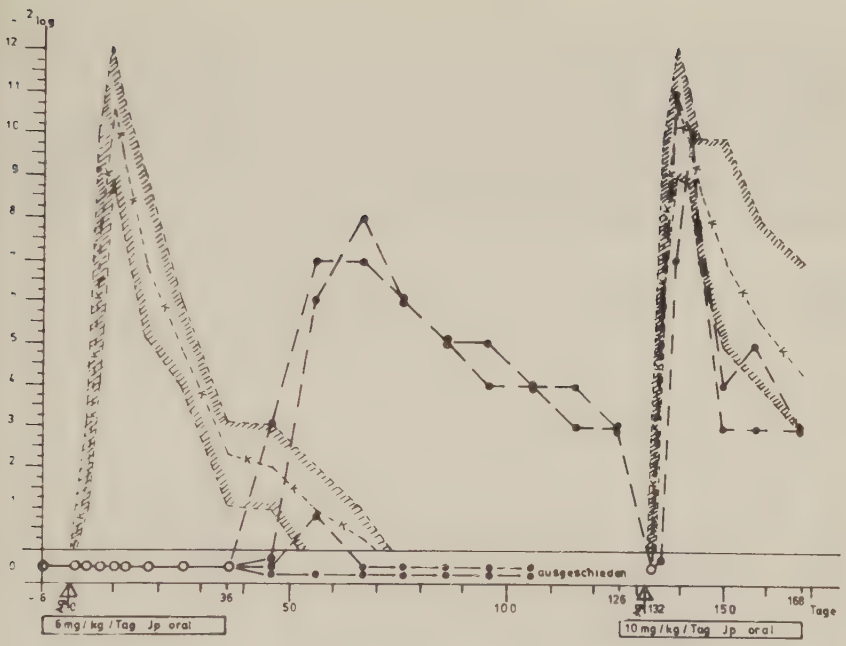

Abb. 4.5: Der Einfluß von 6 mg Ip oral auf die humoralen Antikörperreaktionen

Vgl. Abb. 4.0
Während zwei Tiere nach Absetzen der Medikation keine AK bildeten und für die Sekundärreaktion ausschieden, produzierten die beiden anderen Tiere AK-Titer im medikamentfreien Intervall. Die Sekundärreaktion konnte mit 10 mg/kg Ip oral nicht unterdrückt werden.

Tabelle 5: Die Wirkung von Isophosphamid (oral)und das Verhalten der Kontrolltiere während der immunologischen Primärreaktion

Tage der Blutentnahme	Isophosphamid (oral) 6 mg		Isophosphamid (oral) 8 mg		Kontrollen	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/4	0/4	0/4	0/4	0/5	0/5
1.	4/4	0/4	4/4	0/4	4/5	0/5
4.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
7.	4/4	0/4	4/4	0/4	3/5	4/5
10.	4/4	0/4	4/4	0/4	0/5	4/5
12.	4/4	0/4	4/4	0/4	0/5	4/5
18.	1/4	0/4	3/4	0/4	0/5	4/5
26.	0/4	0/4	3/4	0/4	0/5	4/5
36.	0/4	0/4	1/4	0/4	0/5	4/5

Vgl. Tab. 1
Die AK-Titer während der Behandlung waren in den Ip-Gruppen 0, in der Kontrollgruppe reichten sie von 1:2 bis 1:4096.
Ein Tier der Kontrollgruppe bildete keine AK.

über äquivalenten Dosen Cp oral unter Medikation eine ausgeprägtere depressive Aktivität auf. Bei einem Tier zeigte sich bereits am 46. Tag ein AK-Titer von 1:8 (Abb. 4.5). Während zwei Tiere überhaupt nicht mit einer AK-Bildung antworteten (vollständig supprimierte Primärantwort), tauchten am 56. Tag bei einem weiteren Tier ebenfalls AK auf. Die beiden

AK-produzierenden Tiere besaßen am 67. Tag Titer von 1:256 und 1:128.

8 mg/kg/Tag Ip oral (Gruppe VI) hatte einen ausgeprägten Depressionseffekt auf die AK-Produktion (Tab. 5). Das V-Ag begann erst nach dem 12. Tag und reichte sogar über den 36. Tag hinaus. E-AK

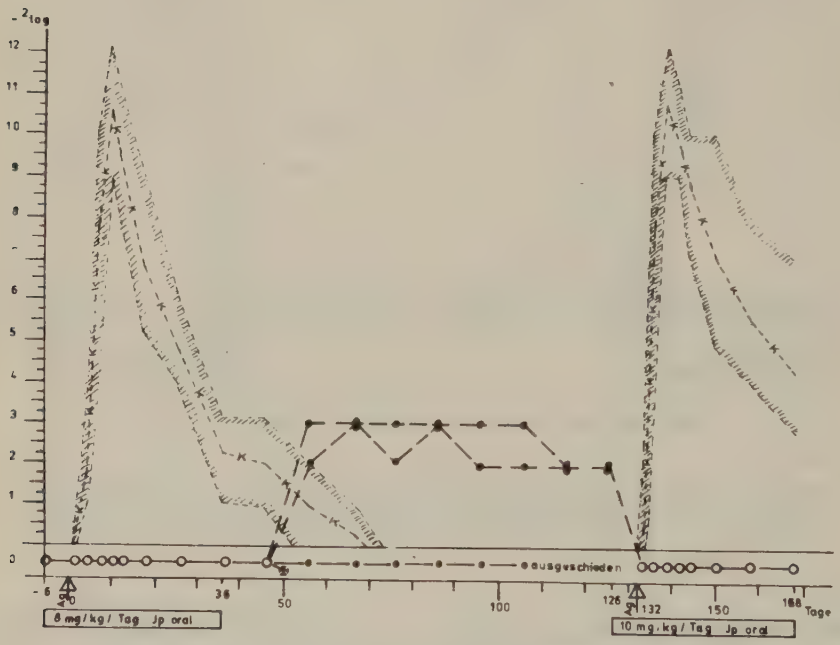

Abb. 4.6: Der Einfluß von 8 mg Ip oral auf die humoralen Antikörperreaktionen

Vgl. Abb. 4.0
Ein Tier verendete am 50. Tag, ein Tier bildete keine und zwei Tiere nur geringe AK-Titer. Es muß bezweifelt werden, ob die Tiere für eine Sekundärreaktion genügend vorsensibilisiert waren, da sich hier keine AK-Titer fanden.

war während der Behandlung bei keinem Tier aufgetreten. Nach Absetzen der Substanz war E-AK erst am 56. Tag nur in niedrigen AK-Titern von 1:4 und 1:8 und am 67. Tag mit dem AK-Gipfel von je 1:8 vorhanden (siehe Abb. 4.6).

Unter Berücksichtigung nur geringer AK-Titer kann festgestellt werden, daß 8 mg Ip bei allen Tieren auch während des medikationsfreien Intervalls erfolgreich die humorale Primärreaktion supprimierte.

3.2.1.4 Verhalten der Antikörper-Titer nach Absetzen der Medikation

Die Tab. 6 und die graphische Darstellung der Durchschnittstiter in Abb. 4.0 - 4.6 spiegeln das Verhalten der einzelnen Gruppen im medikamentfreien Intervall wider.

Tabelle 6: Verhalten der einzelnen Gruppen im medikamentfreien Intervall

Tage der Blutentnahme	Kontr.	Ap intraperitoneal				Ap oral	Cp oral		Ip oral	
		4 mg	6 mg	8 mg	12/15mg	6 mg	6 mg	8 mg	6 mg	8 mg
46.	4/5	2/4	2/4	0/6	0/2	0/4	2/4	2/4	1/4	0/3
56.	3/5	4/4	3/4	0/6	0/0*	0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
67.	1/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
76.	0/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
86.	0/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
96.	0/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
106.	0/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
116.	0/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3
vor	0/5	4/4	3/4	0/6		0/4	3/4	2/4	2/4	0/3

*) Zwei Tiere der Ap-Gruppe verendeten durch die Toxizität von Azathioprin im medikamentfreien Intervall

Vgl. Tab. 1
Die Titer reichten in der Kontrollgruppe auslaufend von 1:8 bis 1:2, in der Ap-4mg-Gruppe bis 1:1024, in der Ap-6mg-Gruppe bis 1:1024, in der Cp-6mg-Gruppe bis 1:256, in der Cp-8mg-Gruppe bei zwei Tieren bis 1:512, bei zwei Tieren nur bis 1:4, in der Ip-6mg-Gruppe bis 1:256 und in der Ip-8mg-Gruppe bei zwei Tieren bis 1:8.

Gruppen ohne AK-Produktion:

Aus der Tab. 6 und den Abb. 4.0 - 4.6 geht hervor, daß 6 mg Ap oral, 8 mg und mehr Ap i.p. und auch 8 mg Ip oral (Titer von 1:8) ausreichen, um die Primärreaktion vollständig, d.h. sogar nach Absetzen der Inhibitor-Substanzen zu supprimieren.

Gruppen mit teilweiser AK-Produktion:

Entsprechend der Höhe der AK-Titer und der Anzahl der positiv reagierenden Tiere ergibt sich eine Gruppenreihenfolge, die mit der Gruppe IX mit 4 mg Ap i.p. und Titern von 1:128 bis 1:2048 (vier von vier Tieren mit AK) angeführt wird. Daran schließen sich an:

Gruppe X 6 mg Ap i.p. und Titern von 1:64 bis 1:4096 (drei von vier Tieren mit AK)
Gruppe II 6 mg Cp oral und Titern von 1:32 bis 1:1024 (drei von vier Tieren mit AK)
Gruppe III 8 mg Cp oral und Titern von 1:128 und 1:2048 (zwei von vier Tieren mit AK)
Gruppe V 6 mg Ip oral und Titern von 1:128 und 1:256 (zwei von vier Tieren mit AK)

Die behandelten Tiere mit verzögerter AK-Produktion bildeten bei den Gruppen II, IX und X am 56. Tag (= 20 Tage nach Medikationsstop), bei den Gruppen III und V am 67. Tag (= 31 Tage nach Medikationsstop) ihren AK-Gipfel aus.

3.2.2 Verhalten humoraler Immunreaktionen nach Zweitimmunisierung bei Tieren mit supprimierter Primärantwort

Die erfolgreiche Supprimierung der Primärreaktion wurde durch folgende immunosuppressive Dosen erreicht:

Cp oral 6 mg/kg/Tag bei 1 von 4 Tieren
Cp oral 8 mg/kg/Tag bei 2 von 4 Tieren
Ip oral 6 mg/kg/Tag bei 2 von 4 Tieren
Ip oral 8 mg/kg/Tag bei 3 von 3 Tieren
Ap i.p. 6 mg/kg/Tag bei 1 von 4 Tieren
Ap i.p. 8 mg/kg/Tag bei 6 von 6 Tieren
Ap oral 6 mg/kg/Tag bei 4 von 4 Tieren

Nach Zweitbegegnung mit dem gleichen Ag unter gleichzeitiger Medikation an Hand des gewählten Schemas produzierte mit Ausnahme eines Tieres der Gruppe III (Cp 8 mg) keines dieser Tiere AK (vgl. Tab. 7).

Tabelle 7: Die Wirkung auf humorale Immunreaktionen nach Zweitimmunisierung bei Tieren der Ap-, Cp-, Ip-Gruppen mit unterdrückter Primärantwort

Tage der Blutentnahme	Azathioprin 6 mg oral		Azathioprin 8 mg i.p.		Cyclophosph. 10 mg		Isophosph. 10 mg	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/4	0/4	0/5	0/5	0/2	0/2	0/5	0/5
1.	4/4	0/4	5/5	0/5	2/2	0/2	5/5	0/5
4.	4/4	0/4	4/4	0/4	2/2	0/2	5/5	0/5
7.	4/4	0/4	4/4	0/4	2/2	0/2	5/5	0/5
10.	3/4	0/4	4/4	0/4	1/2	0/2	5/5	0/5
12.	2/4	0/4	2/4	0/4	1/2	0/2	4/5	0/5
18.	2/4	0/4	0/4	0/4	1/2	0/2	3/5	0/5
26.	1/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2	3/5	0/5
36.	1/4	0/4	0/2*	0/2	0/2	0/2	0/5	0/5

*) Drei Tiere der Ap-Gruppe (10 mg/8 mg Ap i.p.) verendeten durch die Toxizität von Azathioprin.

Vgl. Tab. 1

3.2.3 Humorale Sekundärreaktion

Tabelle 8: Die Wirkung von Cyclophosphamid, Isophosphamid und Azathioprin und das Verhalten der Kontrolltiere während der immunologischen Sekundärreaktion

Tage der Blutentnahme	Cyclophosph. 10 mg		Isophosph. 10 mg		Azathioprin 8 mg		Kontrollen	
	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK	V-Ag	E-AK
vor	0/6	4/6	0/2	2/2	0/7	7/7	0/5	0/5
1.	6/6	0/6	2/2	0/2	4/7	0/7	3/5	1/5
4.	4/6	2/6	2/2	1/2	3/7	5/7	2/5	5/5
7.	4/6	3/6	0/2	2/2	2/7	6/7	0/5	5/5
10.	0/6	6/6	0/2	2/2	2/7	6/7	0/5	5/5
12.	0/6	6/6	0/2	2/2	1/6	5/6	0/5	5/5
18.	0/6	3/6	0/2	2/2	0/6	5/6	0/5	5/5
26.	0/6	3/6	0/2	2/2	0/6	4/6	0/5	5/5
36.	0/4*	3/6	0/2	2/2	0/5**	5/5	0/5	5/5

*) Zwei Tiere der Cp-Gruppe verendeten durch die Toxizität von Cyclophosphamid.

**) Zwei Tiere der Ap-Gruppe verendeten durch die Toxizität von Azathioprin.

Vgl. Tab. 1

Die AK-Titer während der Behandlung reichten in der Cp-Gruppe von 1:32 bis 1:4096, in der I-Gruppe von 1:128 bis 1:2048 und in der Ap-Gruppe von 1:16 bis 1:4096, in der Kontrollgruppe von 1:128 bis 1:4096.

Nach einem behandlungsfreien Intervall von über drei Monaten (bzw. 40 Tagen) wurden alle Tiere mit dem gleichen Ag, 100 mg HSA, reimmunisiert (Tab. 8). Unter den Kontrolltieren befanden sich zwei, die innerhalb der ersten 24 Stunden bereits kein Ag mehr im Serum aufwiesen. Am 7. Tag war bei allen fünf Tieren V-Ag abgeschlossen. Der AK-Nachweis fiel schon am ersten Tag bei einem Tier mit einem Titer von 1:4 positiv aus, während am 4. Tag bei allen Kontrolltieren AK nachweisbar waren (Titer 1:128 bis 1:1024). Am 7. Tag erreichten die Tiere dieser Gruppe AK-Einzeltiter zwischen 1:512 und 1:4096 (Abb. 4.0) ihren Gipfel.

3.2.3.1 Die Wirkung von Azathioprin auf die Sekundärreaktion

Sieben Tiere der Ap-Gruppen IX und X, bei denen die Primärantwort nicht supprimiert werden konnte, erhielten nach dem Applikationsschema (-6. bis 36. Tag) anfangs 10 mg/kg/Tag Ap i.p., ab 7. Tag 8 mg/kg/Tag Ap i.p. und am 0. Tag eine intraperitoneale Reimmunisierung mit 100 mg HSA. Drei von sieben Tieren hatten bereits am 1. Tag kein Ag mehr im Blut. Das V-Ag war erst nach dem 12. Tag abgeschlossen (Tab. 8 und Abb. 4.1, 4.2).

Bei fünf Tieren traten am 4. Tag, bei einem weiteren Tier am 7. Tag zirkulierende AK auf. Der AK-Gipfel lag am 7. Tag zwischen 1:512 und 1:4096 und wich damit nur unwesentlich quantitativ und zeitlich vom AK-Gipfel der Kontrollgruppe ab.

Ein Tier, das im medikamentfreien Intervall AK gebildet hatte, produzierte bei der Sekundärreaktion keine Antikörper. Allerdings wirkte die hier angewandte Dosis von 8 mg/kg/Tag Ap i.p. auf dieses Tier toxisch und führte am 32. Tag zum Tode.

3.2.3.2 Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die Sekundärreaktion

Sechs von acht Tieren der Cp-Gruppen II und III erhielten nach erfolgreicher Primärantwort vom -6. Tag bis 36. Tag nach der Zweitimmunisierung 10 mg/kg/Tag Cp oral. V-Ag setzte am 4. Tag ein und reichte bis zum 10. Tag. E-AK trat bei zwei Tieren am 4., bei den anderen am 7. und 10. Tag ein. Der höchste AK-Titer lag am 12. Tag (Tab. 8 und Abb. 4.3, 4.4) zwischen 1:32 und

1:4096. Ein Tier konnte trotz niedrigen positiven AK-Titern im medikamentfreien Intervall auf einen zweiten Ag-Stimulus nicht erfolgreich supprimiert werden. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen entsprach das Verhalten dieser Gruppe quantitativ und qualitativ eher eine primärimmunologischen Reaktion.

3.2.3.3 Die Wirkung von Isophosphamid auf die Sekundärreaktion

Die Tab. 8 und die Abb. 4.5 verdeutlichen das immunbiologische Verhalten zweier Tiere aus der Ip-6mg-Gruppe, die nach erfolgter Primärantwort dem Applikationsschema gemäß (-6. bis 36. Tag) 10 mg/kg/Tag Ip oral während der Reimmunisierung bekamen. Das V-Ag setzte bei beiden Tieren bereits am 7. Tag ein. Das E-AK begann bei einem Tier am 4. Tag. Am 10. Tag hatten beide Tiere ihren AK-Gipfel mit Titern von je 1:1024. Damit unterschieden sich diese beiden Tiere nur unwesentlich quantitativ und zeitlich vom AK-Gipfel der Kontrollgruppe.

3.2.4 Zelluläre Immunreaktionen

Mit einer intracutanen Ag-Applikation wurde die Beeinflussung der zellulären Immunantwort durch Immunosuppressiva getestet. Die Abb. 5.1 demonstriert das zelluläre Reaktionsergebnis am 18., 36. und am 56. Tag und gibt an, wieviel Tiere bis zu den genannten Tagen eine humorale Immunreaktion zeigten.

Innerhalb der unbehandelten Gruppe I reagierten sowohl humoral als auch zellulär vier von fünf Tieren bis zum 18. Tag. Am 36. Tag fiel der Hauttest nur bei drei von fünf Tieren positiv aus. Am 56. Tag war nur noch bei einem Tier eine humorale und zelluläre Immunreaktion nachzuweisen.

Bei der zellulären Sekundärreaktion antworteten am 18. Tag nur die vier Tiere, die bei der Primärreaktion positiv reagiert hatten, während die humorale Sekundärreaktion bei allen fünf Tieren bis zum 18. Tag ausgebildet war.

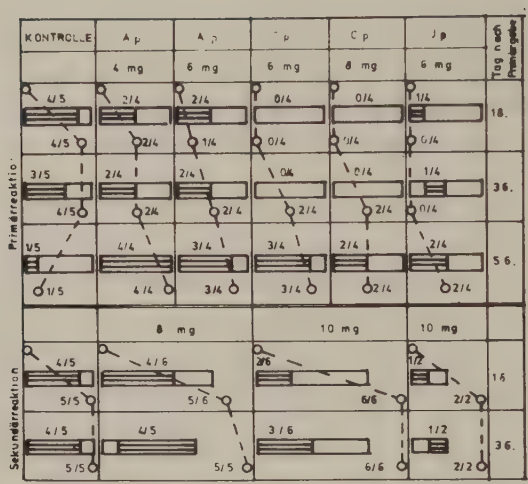

Abb. 5.1: Vergleich der zellulären mit der humoralen Primär- und Sekundärreaktion

Die Abb. gibt in den Säulendiagrammen (▤ positiv, ▭ negativ, ▤▭ teilweise negativ) die Ergebnisse des Intracutantestes an den getesteten Tagen wieder. Der Linienzug o- -o- - -o sagt aus, wieviel Tiere bis zu dem jeweiligen Zeitpunkt positiv mit humoralen AK antworteten. Die neben den Säulen bzw. Punkten stehenden Ziffern bedeuten das numerische Ergebnis. Dabei repräsentiert die Zahl vor dem Schrägstrich die Anzahl der positiv reagierenden Tiere, während die Zahl hinter dem Schrägstrich die Gesamttierzahl der Gruppe widerspiegelt. Es fällt besonders auf, daß Cp im Gegensatz zu Ap und Ip bereits mit 6 mg/kg unter Medikation den Intracutantest supprimiert und sogar auf die Hautreaktion nach Zweitimmunisierung einen deutlichen Einfluß besitzt.

3.2.4.1 Die Wirkung von Azathioprin auf die zelluläre Primär- und Sekundärreaktion

4 mg/kg/Tag Ap i.p. (Gruppe IX) und 6 mg/kg/Tag Ap i.p. (Gruppe X) konnten bei je zwei von vier Tieren am 18. und 36. Tag die zelluläre Immunreaktion nicht supprimieren (Abb. 5.1). Bis zum 56. Tag bildeten mit Ausnahme eines Tieres der Gruppe X alle sieben Tiere positive Hautreaktionen aus. Während dieses Tier der Gruppe X bis zum 56. Tag weder humoral noch zellulär geantwortet hatte, wurden analog den Ergebnissen der zellu-

lären Immunreaktion bis zum 36. Tag je zwei Tiere mit humoraler AK-Bildung registriert und am 56. Tag alle sieben Tiere mit humoralen AK-Titern gefunden. Nach der Zweitimmunisierung gelang es 10 mg/8 mg/kg/Tag Ap i.p. nicht, bei fünf von sechs Tieren die zelluläre und humorale Sekundärantwort zu supprimieren. Ein Tier verendete am 12. Tag, so daß lediglich eine positive humorale AK-Produktion gemessen werden konnte. Nur ein Tier, bei dem im medikamentfreien Intervall Immunreaktionen vom verzögerten und Sofort-Typ registriert werden konnten, zeigte bis zu seinem Tode am 32. Tag weder eine humorale noch zelluläre Immunantwort.

3.2.4.2 Die Wirkung von Cyclophosphamid auf die zelluläre Primär- und Sekundärreaktion

Nach einer Erstimmunisierung hatten weder die Tiere der Gruppe II (6 mg/kg/Tag) Cp oral noch die Tiere der Gruppe III (8 mg/kg/Tag) Cp oral einen positiven Hauttest (Abb. 5.1). Im Gegensatz hierzu war bis zum 36. Tag bei je zwei von vier Tieren und bis zum 56. Tag bei der Gruppe II drei von vier Tieren und der Gruppe III zwei von vier Tieren die humorale AK-Bildung positiv. Ein Tier reagierte in dem genannten Zeitraum nicht, zwei Tiere nach dem 36. Tag nur mit Titern von je 1:2 bzw. 1:4.

Bei sechs Tieren, denen während der Sekundärreaktion 10 mg/kg/Tag Cp oral appliziert wurde, hatten am 18. Tag zwei und am 36. Tag drei Tiere (insgesamt drei Tiere) einen positiven Intracutantest. Hier reagierten alle Tiere mit einer humoralen AK-Bildung bis zum 18. Tag und zeigten damit deutlich Unterschiede im Einfluß von Cp auf die humorale AK-Reaktion einerseits und auf den Intracutantest andererseits. Indem der Intracutantest bei den meisten Tieren aller Gruppen am 56. Tag (20. Tag nach Absetzen der Medikation) ins Positive umschlägt, wird eine vorgetäuschte Suppression der zellulären Immunreaktion aufgedeckt. Die Erklärung liegt vermutlich in der antiphlogistischen Nebenwirkung der Immunosuppressiva.

3.2.4.3 Die Wirkung von Isophosphamid auf die zelluläre Primär- und Sekundärreaktion

In der Gruppe V (6 mg/kg/Tag Ip oral) zeigte nach der Erstimmunisierung am 18. und am 36. Tag je ein Tier eine positive Hautreaktion. Erst nach dem 36. Tag zirkulierten bei diesen Tieren humorale AK im Blut mit AK-Titern von 1:128 und 1:256, während sich bei den beiden anderen Tieren auch nach dem Absetzen der Medikation keine zellulären bzw. humoralen AK nachweisen ließen.

Nach der Zweitimmunisierung konnte eine Dosis von 10 mg/kg/Tag Ip oral bei den beiden Tieren mit erfolgreicher Primärantwort weder die humorale noch die zelluläre Sekundärantwort unterdrücken. Es fand sich bei dem einen Tier am 18. Tag und bei dem anderen am 36. Tag ein positiver Hauttest. Bis zum 18. Tag hatten beide Tiere humoral reagiert. Bei den anderen Tieren blieben sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunreaktion aus.

3.2.4.4 Die Wirkung von Azathioprin, Cyclophosphamid und Isophosphamid auf die zelluläre Immunreaktion bei Tieren mit unterdrückter Primärantwort

10 mg/8 mg/kg/Tag Ap i.p. (Gruppe XI) und höhere Dosen (Gruppe XII und XIII) supprimierten bei der Primärreaktion die humorale sowie auch die zelluläre Ak-Bildung (Abb. 5.2) und ließen unter Medikation auch bei einer zweiten Ag-Zufuhr keine AK im Körper auftreten.

6 mg/kg/Tag Ap oral (Gruppe VIII) wirkte ebenfalls auf die humorale und zelluläre Primärreaktion vollständig immunosuppressiv (Abb. 5.2). Auch hier war eine Zweitimmunisierung nicht in der Lage, unter täglicher Medikation eine AK-Produktion vom Sofort-Typ oder verzögerten Typ aufkommen zu lassen.

8 mg/kg/Tag Ip oral (Gruppe VI) supprimierte die humorale und zelluläre Primärreaktion, wenn man die niedrigen AK-Titer am 56. Tag von 1:4 und 1:8 außer Betracht läßt. Nach einer Zweitimmunisierung bei unterdrückter Primärantwort war 8 mg Ip voll suppressiv auf die zelluläre wie auch die humorale Immunreaktion.

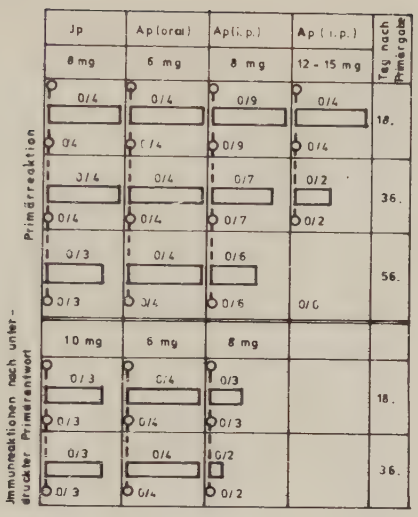

Abb. 5.2: Vergleich der zellulären mit der humoralen Immunreaktion bei Tieren mit unterdrückter Primärantwort

Vgl. Abb. 5.1
6 mg/kg Ap oral und 8 mg/kg Ip bzw. Ap i.p. unterdrückten sowohl die humorale Immunreaktion als auch die Hautreaktion vollständig.

Aus den Ergebnissen der Abb. 5.1 muß gefolgert werden, daß der Intracutantest zur Differenzierung einer unterdrückten oder noch vorhandenen zellulären Immunreaktion ungeeignet ist. Bei nachgewiesenen AK-Titern ist zu erwarten, daß eine Korrelation zwischen humoraler und zellulärer Immunreaktion besteht. Dieses wird durch den positiven Umschlag der Hautreaktion am 56. Tag im medikamentfreien Intervall unterstrichen. Solange keine differenzierte Testmethode vorliegt, darf unter Medikation nicht ohne weiteres von einer unterdrückten zellulären Immunreaktion gesprochen werden.

4. DISKUSSION

4.1 Zur Suppression humoraler Immunreaktionen

4.1.1 Immunologische Primärreaktion

Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente am 3 - 4 kg schweren Kaninchen demonstrieren, daß auf einen einmaligen Antigen(Ag)-Reiz von 100 mg HSA bei gleichem Applikationsschema (6 Tage vor Immunisierung bis 56 Tage danach) deutliche Unterschiede entsprechend der Verabreichungsart und den verschiedenen Substanzen auf die immunologische Primärreaktion vom Sofort-Typ bestehen. Während Ap bei oraler Applikation bereits schon mit 6 mg vollständig die primärimmunologische Antikörper(AK)-Produktion inhibiert, gelingt dies erst mit intraperitonealen Gaben von 9 mg Ap. Im Gegensatz zur oralen Substanzverabreichung macht sich bei der parenteralen Medikation eine ausgeprägte toxische Nebenwirkung bemerkbar.

Diese Befunde der vollständigen Supprimierung der Primärreaktion durch Antimetaboliten stehen im Einklang sowohl mit den Versuchen von Schwartz (1958), Cruchaud (1966) und Finger (1967), als auch mit den Versuchen von Meyer zum Büschenfelde und Freudenberg (1969) mit 6 mg Ap oral, die mit 6 - 9 mg 6-Mercaptopurin (6-Mp) i.m. bzw. 6 mg Ap oral am Kaninchenexperiment erfolgreich waren. Die erheblichen Unterschiede der parenteralen und der oralen Applikation lassen sich an Hand der Untersuchungen an 6-Mp bzw. Ap von Elion (1967) erklären. Hier unterschieden sich die Metaboliten im Urin quantitativ und zeitlich je nach oraler oder parenteraler Gabe, wobei 6-Mp bei oraler Zufuhr länger im Urin nachweisbar war. Eine länger anhaltende Konstanz des Wirkspiegels von Ap scheint demnach der maßgebliche Grund einer Supprimierung der Primärreaktion mit niedrigeren Dosen oralen Ap's zu sein. Außer der im Vergleich zur intraperitonealen Verabfolgung günstigeren immunosuppressiven Wirkung liegt in der größeren Wirkdauer sicherlich auch der kausale Zusammenhang einer geringeren Ausprägung der toxischen Nebenwirkung.

Cp oral gelingt es nicht, mit Ap oral äquivalenten Dosen die immunologische Primärreaktion vom Sofort-Typ bei allen Tieren zu supprimieren. Bei je zwei von vier Tieren traten bereits unter

Medikamentzufuhr am 26. Tag AK in niedrigen Titern auf, worin zu den Ap i.p. Dosen von 4 mg und 6 mg kein Unterschied bestand. Cp 6 und 8 mg wirkte auf zwei Tiere vollständig immunosuppressiv.

Schon bei 6 mg Ip erweist sich im Gegensatz zu 4 mg, 6 mg Ap i.p. und 6 mg, 8 mg Cp oral der Effekt eines ständigen Wirkspiegels der Substanz für die Dauer der Einwirkung als suppressiv auf die humorale Antikörperbildung.

Nach Absetzen der Substanzen am 36. Tag wurde beobachtet, daß Tiere, die unter Medikation keine oder nur geringe AK-Titer gebildet hatten, etwa am 20. Tag nach der letzten Substanzzufuhr einen AK-Gipfel hatten. Schon Hersh (1966) entdeckte bei Patienten, daß eine intensive Kurzzeittherapie mit Antimetaboliten wirksam die Immunreaktion unterdrückt, jedoch 24 Stunden nach der letzten Medikation die Inhibitorfunktion aufhört. Die Immunantwort erlangt wieder die Potenz der Lymphozytenvermehrung und der Antikörpersynthese. Eine schnelle Rückkehr des Mitosepotentials im lymphatischen Gewebe wird angenommen. Auch Hoppe konnte 1968 (I) berichten, daß schon wenige Tage nach intensiver Schädigung durch Cp die immunologischen Stammzellen auf einen Ag-Reiz oder durch Persistenz des Ag's wieder reagieren können. Ob in den vorliegenden Versuchen jedoch die Persistenz des Ag's ursächlich an diesem AK-Anstieg beteiligt ist, muß bei einer Halbwertzeit des Albumins von $T_{1/2}$ = 9 Tage (Schultze 1966) bezweifelt werden. Anscheinend wurde das Ag von den immunkompetenten Zellen bereits verarbeitet, doch konnte ein konstanter Wirkspiegel der immunosuppressiven Substanzen die Proliferation bzw. die Differenzierung der Progenitor-Zelle (PC-Zelle, bei Makinodan 1965) in die AK-produzierende Zelle hemmen. Während alle AK-bildenden Tiere (7 von 8) mit niedrigen intraperitonealen Ap-Gaben nach Absetzen der Substanzen den maximalen Titerwert der Kontrolltiere erreichten und innerhalb der Cp-Gruppen und der Ip-Gruppen 6 mg je 2 von je 4 Tieren mit reduzierten AK-Titern reagierten, antworteten die übrigen AK-bildenden Tiere der Cp-Gruppen (2 von 8 Tieren) und Ip-Gruppen (3 von 8 Tieren) im medikamentfreien Intervall mit äußerst niedrigen AK-Titern von 1:2 bis 1:8. Unter Vernachlässigung dieser AK-Titer kann hier von einer erfolgreichen Supprimierung der Primärantwort gesprochen werden.

Da die Purinantagonisten die Ak-Bildung in der medikamentfreien Nachphase eher im Sinne eines "Alles oder Nichts-Gesetzes" beeinflußten, traten eindeutige Unterschiede der Wirkung von Alkylantien und Antimetaboliten auf, die sich folgendermaßen erklären lassen: Nach Potel (1968) ist die Wirkung von Alkylantien und Antimetaboliten auf den Nucleinsäurestoffwechsel "ähnlich". Die DNA-Synthese wird beträchtlich und die RNA-Synthese kaum eingeschränkt. Ap, das in vivo einer langsameren Wirkung von 6-Mp (Elion 1967) entspricht, stört hauptsächlich den immunologischen Prozeß kurz nach der Ag-Gabe, d.h. die induktive Phase (Übersicht bei Sterzl 1967) durch Verdrängung essentieller Bausteine für die Synthese der Nucleinsäuren. Cp hingegen greift auch noch zu einem späteren Zeitpunkt in die Ak-Bildung ein (Potel 1968), was in seinem Einfluß auf spezifische Eiweißkörper und damit auf die Zellvermehrung eine Begründung findet (Übersicht bei Potel 1965).

Nach den vorliegenden Befunden der Ak-Produktion im medikamentfreien Intervall ist besonders im Anschluß an nicht voll immunosuppressive Dosen Ap ein Anstieg der Ak-Titer auf Werte der Kontrollgruppen mit einer reversiblen Hemmung der Differenzierung der y-Zelle in die z-Zelle zu erklären (nach x-y-z-Schema bei Sterzl 1967).

Die Wirkung der alkylierenden Substanzen, besonders aber die von Ip mit einem anhaltenden Effekt auf das Immungeschehen im medikationsfreien Intervall, läßt sich auf proliferationshemmende Effekte zurückführen, wie sie Palme 1965 bei Cp auf die prämitotische Ruhephase G_2 und auf die AK-Synthese feststellte.

Daß die Primärreaktion vollständig unterdrückt war, bewiesen die Tiere, die nach einer Zweitimmunsierung und gleichzeitiger Medikation keine AK produzierten. Cp (mit 2 von 8 Tieren), Ip (mit 5 von 7 Tieren), Ap i.p. (mit 7 von 10 Tieren) und Ap oral (mit 4 von 4 Tieren) bestätigen die Versuche von Meyer zum Büschenfelde und Freudenberg (1969) (siehe auch Potel 1965), in denen die Tiere nach supprimierter Primärreaktion auf einen zweiten Ag-Stimulus mit einer primärimmunologischen Reaktion antworteten. Diese zweite "Primärreaktion" wurde bei den genannten Tieren

erfolgreich supprimiert. Das abweichende Verhalten eines Tieres der Cp-Gruppe, das im medikamentfreien Intervall mit schwach positiven Titern reagierte (1:4) und auf einen zweiten Ag-Stimulus eine ausgeprägte AK-Reaktion besaß, wurde hier als nicht unterdrückte Primärantwort aufgedeckt.

4.1.2 Immunologische Sekundärreaktion

Die immunologische Sekundärreaktion wurde bei Ap i.p. mit 8 mg an der Grenze der Verträglichkeit geprüft. Nur ein Tier der Ap-Gruppe supprimierte erfolgreich die immunologische Sekundärreaktion vom Sofort-Typ. Es verendete jedoch am 32. Tag nach der Zweitimmunisierung. Dieser Befund steht im Einklang mit der erfolgreichen Suppression der Sekundärreaktion durch toxische Dosen 6-Mp bei La Plante (1962) und Ap oral bei Meyer zum Büschenfelde und Freudenberg (1969). Die immunologische Sekundärreaktion der übrigen mit Ap behandelten Tiere wich nur unwesentlich zeitlich und quantitativ von den Kontrollgruppen ab.

Obwohl Cp in einer Dosis verabreicht wurde, die bei zwei von sieben Tieren am 26. und 32. Tag nach der Zweitimmunisierung zum Tode führte, konnte die Sekundärreaktion vom Sofort-Typ ebensowenig wie mit Ip 10 mg verhindert werden.

Die Depression auf die AK-Bildung war jedoch unter dem Einfluß beider Alkylantien derartig, daß nur ein primärimmunologischer Reaktionstyp auftrat.

Mit Rücksichtnahme auf das x-y-z-Schema lassen sich folgende Überlegungen anstellen: Nach Sterzl (1967) ist die Transformierung der y-Zelle in die z-Zelle ein Teil der Primär- und Sekundärreaktion und 6-Mp empfindlich. Hoppe (1967) gibt an, daß mit der Zunahme der Zahl der y-Zellen der immundepressive Effekt einer konstante Zytostatikadosis (Cp) sinke, was mit der Erklärung der erfolglosen Hemmung der Sekundärreaktion mit noch tolerierten Dosen Ap, Cp, Ip wegen der hohen Proliferationsrate ohne weiteres in Übereinstimmung zu bringen ist.

Alkylantien, die die Synthese der DNA und Kern-RNA inhibieren, können im Gegensatz zu den Antimetaboliten sowohl während der Induktionsphase als auch zu jedem anderen Zeitpunkt der AK-Bildung

hemmend eingreifen (siehe Schwartz, Borel 1969), was bei den gewählten Dosen in einem größeren Depressionseffekt auf die Sekundärreaktion zum Ausdruck kommt. Nach diesen Befunden scheint sich zu bestätigen, daß die Wirkung vornehmlich der Alkylantien auf die Sekundärreaktion eher von quantitativen Einflüssen abhängt.

4.2 Zur Suppression zellulärer Immunreaktionen

Die Resultate der zellulären Immunreaktion differieren z.T. von den Ergebnissen der humoralen Antikörperantwort. Während die Kontrolltiere bis auf ein Tier einheitlich Immunreaktionen sowohl vom verzögerten Typ als auch vom Sofort-Typ nach Erst- und Zweitimmunisierung ausbildeten, zeigten die Tiere der anderen Gruppen Diskrepanzen in den beiden Reaktionstypen.

Hierfür dürfte in erster Linie der gewählte Intracutantest zum Nachweis einer zellulären Immunreaktion verantwortlich sein. Während ohne Medikation mit Immunosuppressiva eine gute Korrelation zwischen zellulärer (Intracutantest) und humoraler Immunreaktion besteht, kommt unter Medikation das breite Wirkungsspektrum der Substanzen, vor allem aber die antiphlogistische Komponente zum Tragen. Eine Suppression der Immunreaktion vom verzögerten Typ kann hierdurch vorgetäuscht werden, was in Dosisbereichen von 6 mg und 8 mg Cp, 4 mg und 6 mg Ap i.p. und 6 mg Ip deutlich wird.

Diese Ergebnisse des Intracutantestes stehen im Einklang mit den Befunden von Borel und Schwartz (1964), die einen auffallenden Unterschied zwischen Sofort- und Spätreaktion konstatierten, wenn 6-Mp nur kurze Zeit appliziert wurde. Die Ergebnisse erklären weiterhin die Experimente von Levin (1964) und Schwartz (1967), die mit 6-Mp bzw. Ap die Hautreaktion supprimierten. Besonders Cp täuscht in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls eine starke suppressive Wirkung auf die primär- und sekundärimmunologische Reaktion vom verzögerten Typ vor. Bereits Page (1962) wies einen erhöhten antiphlogistischen Effekt von 6-Mp bei längerer Verabreichung nach. Maguire und Maibach (1961) stellten am Meerschweinchen fest, daß Cp sehr gut die verzögerte Immunantwort inhibiert, daß jedoch bestehende humorale Immunreaktionen resistent gegen Cp sind (1963). Nach Schwartz (1969) muß aber beim Einfluß

von Cp auf die Immunreaktion vom verzögerten Typ eine antiphlogistische Wirkung einerseits und eine temporäre Hemmung der Multiplikation von sensibilisierten Lymphozyten andererseits berücksichtigt werden.

Diese beiden Komponenten spielen sicherlich bei nicht vollständig immunosuppressiven Dosen der gewählten Medikamente in unterschiedlichem Maß eine Rolle. Doch muß zur Erklärung der totalen Immunosuppression (humoral und Intracutantest) eine Ausschaltung des zellulären Immunsystems durch eine Verhinderung der Induktion des Antigens oder auch durch einen Einfluß auf die immunologische Gedächtniszelle diskutiert werden. Allerdings kann die Frage nach einem differenten immunologischen Gedächtnis für humorale und zelluläre Reaktionen nicht positiv beantwortet werden, da bei der angewandten relativ groben Methode zwischen einer antiphlogistischen, einer antiproliferativen und einer immunosuppressiven Wirkung nicht unterschieden werden konnte.

4.3 Zur Toxizität der gewählten Substanzen in Relation zur immunosuppressiven Aktivität

Die proliferationshemmende Wirkung der Immunosuppressiva beschränkt sich nicht nur auf das lymphatische System und das Knochenmark (Hunstein 1967), sondern auch auf die hier beobachteten Blutbild- und Gewichtsveränderungen. Als Parameter der Toxizität dienten der Grad der schädigenden Wirkung auf das weiße Blutbild und der Grad des Gewichtszuwachses in Relation zu den Kontrollen bzw. der Anteil der verendeten Tiere. Bei äquivalenten Dosen von 6 und 8 mg/kg Cp, Ip und Ap oral wird Gewichtszunahme kaum und Granulopoese schwach gehemmt, ganz im Gegensatz zu Ap i.p. Hieraus ergeben sich im Vergleich zur oralen Ap-Gabe eindeutige Unterschiede der Wirksamkeit, die bereits Elion bei verschiedener Applikationsart für 6-Mp bzw. Ap auf pharmakodynamischer Ebene nachgewiesen hat. Diese Differenzen betreffen in unseren Experimenten nicht nur die immunologische Reaktion, sondern auch die diskutierten toxischen Nebenwirkungen (Blutbildveränderungen und Gewicht). Während in der 6 mg/kg Ip-Gruppe ein Kaninchen aus ungeklärtem Grunde verendete und bei den übrigen Tieren der Gruppe

das Durchschnittsgewicht konstant blieb, kamen bei 10 mg/kg Cp zwei von acht Tieren nach terminalem Gewichtsverlust ad exitum. Durch 8 mg/kg Ap i.p. verendeten bereits vier von zehn Tieren und bei höheren Dosen sogar alle Tiere. Neben Einflüssen auf das Körpergewicht treten bei allen behandelten Gruppen, besonders aber wieder bei den Ap i.p. Gruppen, Tendenzen zur Leukopenie auf. Die Vorzüge einer oralen Ap-Dosierung beziehen sich demnach nicht nur auf die günstigen immunosuppressiven Wirkungen, sondern ebenfalls auf den geringeren toxischen Einfluß. Eine parenterale immunosuppressive Therapie scheint nicht angebracht zu sein.

4.4 Kritische Einstufung der gefundenen Ergebnisse

In der Literatur haben verschiedene Autoren eine vergleichende Testung von Cp, Ip und Ap beschrieben. Hoppe (1967) untersuchte die Immunodepression von Einzeldosen Cp (i.p.), Ip (i.p.) und Ap(oral) bei Mäusen in der In-vivo-Kultur. Hobik (1969) stellte im Graft-versus-host-Versuch in der Maus fest, daß Cp im DL_{10}-Bereich besser als Ap wirkt. Auch der Rattenversuch von Brock (1967) ergab eine hohe Wirksamkeit von Ip gegenüber Cp und Ap bei fraktionierter viermaliger Applikation, während Sterzl (1969) in seiner In-vivo-Kultur mit den Purinantagonisten (u.a. 6-Mp s.c.) allei eine vollständige Immunosuppression erreichte.

Das vorliegende Experiment kann nicht ohne weiteres mit diesen Versuchen verglichen werden, da vor allem ein Unterschied in den Versuchsmodellen und in der Wahl der Tierspezies besteht. Wenn jedoch die Beurteilung verschiedener Immunosuppressiva im Tierexperiment für eine Anwendung im klinisch-praktischen Bereich richtungsweisend sein soll, so muß neben der spezifisch immunologischen Aktivität auch der toxische Einfluß unter sukzessiver Medikation, die eher einer Langzeittherapie beim Menschen entspricht, berücksichtigt werden. Die vorliegenden Versuche ergaben, daß intraperitoneale Gaben Ap entscheidende Nachteile sowohl in der immunologischen als auch in der toxischen Wirkung gegenüber einer oralen Ap-Applikation bieten. Da Ip bei etwas höheren Dosen voll immunosuppressiv wirkt und äquivalente Dosen Cp nicht bei allen Tieren die Immunreaktionen supprimiert, werden diese Substanzmengen ebensogut wie die von Ap oral vertragen. Diese Befunde lassen sich

nicht ohne weiteres auf andere Spezies oder gar den Menschen übertragen. Bereits Finger (1967) stellte Unterschiede in der Wirkung von Immunosuppressiva auf bestimmte Tierarten fest, was nach Sterzl (1967) auf unterschiedliche regenerative und proliferative Aktivitäten zurückzuführen ist. Eine Aussage für die klinische Anwendung wird durch die vorliegenden Ergebnisse jedoch insofern gegeben, als sie gerade wegen der reversiblen Hemmung der AK-Antwort bei den Alkylantien und mehr noch bei den Antimetaboliten eine Dauertherapie fordern. Da die immunbiologischen Phänomene noch nicht vollständig auf molekularer Ebene geklärt sind und die immunosuppressiven Dosen im Tierexperiment höher liegen als im klinischen Anwendungsbereich, kann das vorliegende Experiment allerdings nur in seiner Tendenz beantworten, wieweit sich eine klinische Indikation ableiten läßt.

Die durchgeführten Versuche verdeutlichen, daß Ap oral und Ip oral im nicht toxischen Dosisbereich gleichermaßen gut eine primärimmunologische Reaktion supprimieren, jedoch in eine immunologische Sekundärreaktion während des untersuchten Zeitraums nur unerheblich eingreifen. Da bei den Autoimmunkrankheiten des Menschen das Stadium der Sekundärreaktion vorliegt, kann eine direkte aetiopathogenetische Beeinflussung von diesen Substanzen nicht erwartet werden. Ihre positive Wirkung dürfte ausschließlich eine antiproliferative sein. Dieses Stadium der Immunreaktion ist aber für die Pathogenese von größter Bedeutung. Da Ag-Aufnahme und Ag-Verarbeitung, d.h. die induktive Phase der Immunreaktion bei den Autoimmunkrankheiten unbeeinflußt bleiben, empfiehlt sich für die Unterdrückung der Proliferation eine Dauermedikation. Dieses Ergebnis entspricht den klinischen Erfahrungen bei immunologischen Krankheiten (Scheiffarth 1969). In Zukunft werden In-vitro-Testsysteme notwendig sein, die eine absolute Messung der immunosuppressiven Wirkspiegel erlauben (Bach 1969). So können gleichzeitig Testungen zellulärer und humoraler Immunreaktionen bei Autoimmunkrankheiten unter immunosuppressiver Therapie neue Einblicke in Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Immunosuppressiva beim Menschen erbringen, die im Tierexperiment durch erste Versuche schon erreicht wurden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung sukzessiver Gaben von Azathioprin, Cyclophosphamid und Isophosphamid auf die von löslichem Proteinantigen ausgelöste immunologische Reaktion vom Sofort-Typ und verzögerten Typ wurde geprüft:

1. 6 mg/kg Azathioprin oral und 8 mg/kg Isophosphamid oral unterdrücken vollständig die Primärreaktion vom Sofort-Typ und die Hautreaktion im nicht toxischen Dosisbereich.

2. Äquivalente Dosen Cyclophosphamid oral supprimieren nur teilweise die Primärreaktion vom Sofort-Typ und zeigen eine ausgezeichnete Wirkung auf die Hautreaktion.

3. Orale Applikationen von Azathioprin sind bei starker immunosuppressiver Wirkung und gleichzeitig geringer Toxizität intraperitonealen Gaben vorzuziehen.

4. Nach erfolgreicher Unterdrückung der Primärreaktion sind auch auf einen zweiten Antigen-Stimulus bei gleichzeitiger Medikation von 6 mg Ap oral, 8 mg Ap i.p., 10 mg Cp oral und 10 mg Ip oral keine Antikörper nachzuweisen.

5. Unter Medikation mit 6 mg/kg Isophosphamid wird eine AK-Bildung nach der Erstimmunisierung verhindert.

6. Azathioprin i.p., Cyclophosphamid und Isophosphamid oral können in den angewandten Dosen (10 mg/8 mg bzw. je 10 mg) die Sekundärreaktion nicht unterdrücken.

7. Der Intracutantest ist zur Untersuchung des immunosuppressiven Einflusses der gewählten Substanzen auf die zelluläre Immunreaktion nicht geeignet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bach, I.F., Dardenne, M. and C. Fournier: In vitro Evaluation of Immunosuppressive Drugs. Nature 222:998-999 (1969)

2. Brock, N.: Pharmakologische Untersuchungen mit neuen N-Chloräthyl-Phosphorsäurcester-Diamiden. V. Int. Kongr. Chemotherapie, Verh. III: 155-161 (1967)

3. Cruchaud, A.: Immunologie Tolerance Induced by a Combination of Chloramphenicol and 6-Mercaptopurine. J. Immunol., Vol. 96:832-841, (1966)

4. Dukor, P. und F.M. Dietrich: Medikamentöse Erzeugung spezifischer Immuntoleranz: Besonderheiten der immunosuppressiven Wirkung von Cyclophosphamid und Kortison. Aus: Organtransplantation, Stuttgart 1969, S. 255-268

5. Elion, G.B.: Biochemistry and Pharmacology of Purine Analogues. Fed. Proc. 26:898-904 (1967)

6. Finger, H.: Die Depression der primären Immunitätsreaktion durch 6-Mercaptopurin und Cyclophosphamid bei verschiedenen Tierarten. I. Die Unterdrückung der primären Immunitätsreaktion von Kaninchen durch 6-Mercaptopurin und deren Beeinflußung durch bakterielle Endotoxine. Zschr. ges. exp. Med., Vol. 142:45-56 (1967)

7. Finger, H.: Die Depression der primären Immunitätsreaktion durch 6-Mercaptopurin und Cyclophosphamid bei verschiedenen Tierarten. II. Die unterschiedliche Beeinflußung der Antikörperbildung von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen durch 6-Mercaptopurin und Cyclophosphamid. Zschr. ges. exp. Med., Vol. 143:105-120 (1967)

8. Finger, H., Emmerling, P. und E. Brüss: Das immunologische Gedächtnis der Maus nach Cyclophosphamid-Behandlung. Zschr. f. Immunitätsforsch. 138:191-206 (1969)

9. Hersh, E.M., Carbone, P.P. und E.J. Freireich: Recovery of Immune Responsiveness after Drug Suppression in Man. J. Lab. Clin. Med. 67:566-572 (1966)

10. Hobik, H.P.: Der Einfluß immunosuppressiver Agenzien auf die Graft-versus-Host-Reaktion in der Maus. Aus: Organtransplantation, Stuttgart 1969, S. 269-274

11. Hopf, U.: Immunologische Toleranz. Klin. Wschr. 49:177-193 (1971)

12. Hoppe, I.: Der Einfluß von Zytostatika auf die Antikörperbildung in der In-Vivo-Kultur. V. Int. Kongr. Chemotherapie, Verh. III: 631-636 (1967)

13. Hoppe, I., Masaoka, T. und E. Jahn: Faktoren mit Einfluß auf den immunsuppressiven Endoxaneffekt. I. Das Verhalten der immunologischen Stammzellen. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74:1264-1267 (1968)

14. Hoppe, I., Weise, W. und T. Masaoka: Faktoren mit Einfluß auf den immunsuppressiven Endoxaneffekt. II. Der Therapieplan. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74:1267-1270 (1968)

15. Hoppe, I.: Die Erholung des immunologischen Stammzellkompartments nach Einwirkung von Endoxan-Einzeldosen. Aus: Organtransplantation, Stuttgart 1969, S. 281-285

16. Hunstein, W. Perings, E. und E. Klose: Tierexperimentelle Langzeitversuche mit Azathioprine (Imuran) zur Prüfung seiner myelotoxischen Wirkung. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 73:450-457 (1967)

17. Kunitsch, G. und H.St. Stender: Kombinierte immunsuppressive Maßnahmen zur Verlängerung der Überlebenszeit von Hauttransplantaten.
Aus: Organtransplantation, Stuttgart 1969, S. 275-280

18. Largiadèr, F. (Hrsg.): Organtransplantation. Stuttgart 1970

19. La Plante, E.S., Condie, R.M. und R.A. Good: Prevention of Secondary Immune Response with 6-Mercaptopurine.
J. Lab. Clin. Med. 59:542-549 (1962)

20. Levin, R.H., Landy, M. und E. Frei: The Effect of 6-Mercaptopurine on Immune Response in Man. New Engl.
J. Med. 271:16-22 (1964)

21. Maguire, H.C. and H.J. Maibach: Effect of Cyclophosphamide, 6 Mercaptopurine, Actinomycin D and Vincaleukoblastine on the Acquisition of Delayed Hypersensitivity (DNC B Contact Dermatitis) in the Guinea Pig.
J. Invest. Derm. 37:427-31 (1961)

22. Maibach, H.J. and H.C. Maguire: Elicitation of Delayed Hypersensitivity in Markedly Panleukopenic Guinea Pigs.
J. Invest. Derm. 41:123-127 (1963)

23. Makinodan, T., Albright, J.F., Perkins, E.H. and P. Nettesheim: Suppression of Immunologic Responses. Med. Clin. N. Amer. 49:1569-1596 (1965)

24. Makinodan, T. and J.F. Albright: Proliferative and Differentiative Manifestations of Cellulare Immune Potential.
Progr. Allergy, Vol. 10:1-56 (1966)

25. Martin, H. et al.: Erfahrungen mit neuartigen N-Lost-Phosphamidestern.
Dtsch. med. Wschr. 95:491-497 (1970)

26. Maßhoff, W.: Die Morphologie der Immunitätsreaktionen.
Dtsch. med. Wschr. 94:554-559 (1969)

27. McKenzie, I.F.C. and S. Whittingham: Deposits of Immunoglobulin and Fibrin in Human Allografted Kidneys.
Lancet, 1968, Vol. 2:1313-1316

28. Meyer zum Büschenfelde, K.H.: Immunosuppressive Therapie der chronischen Hepatitis.
Dtsch. Med. J. 20:522-527 (1969)

29. Meyer zum Büschenfelde, K.H. und J. Freudenberg: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Azathioprin auf die Bildung zirkulierender Antikörper.
Klin. Wschr. 47:379-382 (1969)

30. Nakayama, M., Schuster, J. und W. Schoyerer: Klinische und tierexperimentelle Erfahrungen mit der Endoxan-Stoßtherapie.
Dtsch. med. Wschr. 92:1915-1919 (1967)

31. Nathan, P., Gonzales E., Pescovitz, H., Fowler, R. and B.F. Miller: The Influence of 6-Mercaptopurine on Survival of Homologous Rabbit Kidney Transplants.
Fed. Proc. 19:216 (1960)

32. Nathan, H.C., Bieber, S., Elion, G.B. und G.H. Hitchings: Detection of Agents which Interfere with the Immune Response.
Proc. Soc. Biol. Med., Vol. 107:796-799 (1961)

33. Page, A.R., Condie, R.M. and R.A. Good: Effect of 6 Mercaptopurine on Inflammation.
Amer. J. Path. 40:519-530 (1962)

34. Palme, G. and E. Liss: Effect of Alkylating Agents on the Life Cycle of Ehrlich Tumour Cells. Autoradiographic Studies. Europ. J. Cancer, Vol. 1:245-251 (1965)

35. Potel, J.: Die Beeinflußung immunologischer Reaktionen durch cancerotoxische Substanzen.
Arzneimittel-Forsch. 15:527-532 (1965)

36. Potel, J., Kröger, H. und D. Papanastasiu: Einfluß von Endoxan und 6-Mercaptopurin auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel der Rattenmilz während der Synthese von Antikörpern gegen Brucella abortus.
Zschr. Naturforsch. 23b:73-77 (1968)

37. Potel, J.: Immunsuppression durch kanzerotoxische Substanzen.
Aus: Organtransplantation, Stuttgart 1969, S. 287-292

38. Reams, G.B.: Use of Cyclophosphamide in an Attempt to Modify the Canine Renal Homograft Response.
Nature 197:713-714 (1963)

39. Robinson, J.L. und C.L. Christian: 6-Mercaptopurine in Immunological Responsiveness.
Nature 187:796-797 (1960)

40. Rowley, M.J., Mackay, J.R. and J.F.C. McKenzie: Antibody Production in Immunosuppressed Recipients of Renal Allografts.
Lancet, 1969, Vol. 2:708-710

41. Scheiffarth, F. und H. Warnatz: Langzeitbehandlung von Immunopathien unter besonderer Berücksichtigung immunsuppressiver Medikamente.
Dtsch. med. Wschr. 94:2444-2449 (1969)

42. Schubert, J.C.F., Schubert, H., Holtz, G. und H. Martin: Immunosuppressive Langzeittherapie des Lupus erythematodes visceralis.
Dtsch. med. Wschr. 95:1768-1774 (1970)

43. Schulze, H.E. und J.F. Heremans: Molekular Biology of Human Proteins.
Amsterdam, London, New York 1966, Vol. I: 479

44. Schwartz, R., Stack, J. and W. Dameshek: Effect of 6-Mercaptopurine on Antibody Production.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99:164-167 (1958)

45. Schwartz, R., Eisner, A. and W. Dameshek: The Effect of 6-Mercaptopurine on Primary an Secondary Immune Responses.
J. Clin. Invest. 28:1394-1403 (1959)

46. Schwartz, R. and W. Dameshek: The Role of Antigen Dosage in Drug-induced Immunologic Tolerance.
J. Immunol., Vol. 90:703-710 (1963)

47. Schwartz, R. and Y. Borel: Inhibition of Immediate and Delayed Hypersensitivity in the Rabbit by 6-Mercaptopurine.
J. Immunol., Vol. 92:754-761 (1964)

48. Schwartz, R. and M.A. Swanson: Immunosuppressive Therapy. The Relation between Clinical Response and Immunologic Competence.
New Engl. J. Med. 277:163-170 (1967)

49. Schwartz, R. and Y. Borel: Principles of Immunosuppressive Drug Action.
Aus: Textbook of Immunopathology. New York and London 1968, Vol. I: 227-235

50. Sever, J.L.: Applications of a Microtechnique to Viral Serological Investigations.
J. Immunol. 88:320-329 (1962)

51. Stavitski, A.B.: Micromethods for Study of Proteins and Antibodies: Procedure and General Applications of Hemagglutination and Hemagglutinations-Inhibitions with Tannic Acid and Protein-Treated Red Blood Cells.
J. Immunol. 72:360-367 (1954)

52. Sterzl, J.: The Effect of Immunosuppressive Drugs at Various Stages of Differentiation of Immunologically Competent Cells.
Aus: Immunity, Cancer and Chemotherapy. New York, London 1967, S. 71-101

53. Sterzl, J.: Studies on Differentiation of Immunocompetent Cells Using Immunological Inhibition.
Antibiotica et Chemotherapie, Vol. 15:135-154 (1969)

54. Talmage, D.W., Dixon F.J., Bukantz, S.C. and G.J. Dammin: Antigen Elimination form the Blood as an Early Manifestation of the Immune Response.
J. Immunol. Vol. 67:243-255 (1951)

Herrn Professor Dr. med. Dr. med. vet.
Karl-Hermann MEYER ZUM BÜSCHENFELDE,
der die vorliegende Arbeit angeregt und
stets mit wohlwollendem Interesse in
guter Zusammenarbeit und fördernder Kri-
tik begleitet hat, bin ich dankbar ver-
pflichtet.

LEBENSLAUF

30. Dezember 1947	in Herborn/Dillkreis als Sohn des Baudirektors Dipl.-Ing. Helmut Brodehl und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Droß, geboren
Ostern 1954	Eintritt in die Grundschule in Frankfurt/Main
Herbst 1955	Umzug meiner Eltern nach Kassel-Wilhelmshöhe
Ostern 1958	Aufnahme in das Wilhelmsgymnasium in Kassel
Herbst 1961	Umzug meiner Eltern nach Idstein/Ts.
November 1966	Reifeprüfung am Pestalozzigymnasium in Idstein/Ts.
WS 1966 bis WS 1968/69	immatrikuliert an der Johann-Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/M. bis zur Ärztlichen Vorprüfung
ab SS 1969	cand. med. an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, wo ich im Frühjahr 1972 das Staatsexamen ablegen will.